

Aus der Abteilung für Experimentelle Chirurgie
und Pathologische Biochemie
(Vorstand: Prof. Dr. med. W. Lorenz)
an der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg/L.
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Hamelmann)

Die Diaminoxydase des Hundedünndarmes: Reinigung,
enzymatische Eigenschaften und pathophysiologische
Bedeutung bei intestinaler Ischämie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
im Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Karl-Theodor Schumann
aus Petershagen

Marburg 1975

1976

Aus der Abteilung für Experimentelle Chirurgie
und Pathologische Biochemie
(Vorstand: Prof. Dr. med. W. Lorenz)
an der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg/L.
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Hamelmann)

Die Diaminoxydase des Hundedünndarmes: Reinigung,
enzymatische Eigenschaften und pathophysiologische
Bedeutung bei intestinaler Ischämie



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
im Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Karl-Theodor Schumann
aus Petershagen

Marburg 1975





Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität am 23. 1. 1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen

Referent: Prof. Dr. med. W. Lorenz

Correferent: Priv.-Doz. Dr. med. H. Richter

I. Vorwort	1
II. Die Entstehung des Buches	2
III. Die Entstehung des Buches	3
IV. Die Entstehung des Buches	4
V. Die Entstehung des Buches	5
VI. Die Entstehung des Buches	6
VII. Die Entstehung des Buches	7
VIII. Die Entstehung des Buches	8
IX. Die Entstehung des Buches	9
X. Die Entstehung des Buches	10
XI. Die Entstehung des Buches	11
XII. Die Entstehung des Buches	12
XIII. Die Entstehung des Buches	13
XIV. Die Entstehung des Buches	14
XV. Die Entstehung des Buches	15
XVI. Die Entstehung des Buches	16
XVII. Die Entstehung des Buches	17
XVIII. Die Entstehung des Buches	18
XIX. Die Entstehung des Buches	19
XX. Die Entstehung des Buches	20
XXI. Die Entstehung des Buches	21
XXII. Die Entstehung des Buches	22
XXIII. Die Entstehung des Buches	23
XXIV. Die Entstehung des Buches	24
XXV. Die Entstehung des Buches	25
XXVI. Die Entstehung des Buches	26
XXVII. Die Entstehung des Buches	27
XXVIII. Die Entstehung des Buches	28
XXIX. Die Entstehung des Buches	29
XXX. Die Entstehung des Buches	30
XXXI. Die Entstehung des Buches	31
XXXII. Die Entstehung des Buches	32
XXXIII. Die Entstehung des Buches	33
XXXIV. Die Entstehung des Buches	34
XXXV. Die Entstehung des Buches	35
XXXVI. Die Entstehung des Buches	36
XXXVII. Die Entstehung des Buches	37
XXXVIII. Die Entstehung des Buches	38
XXXIX. Die Entstehung des Buches	39
XL. Die Entstehung des Buches	40
XLI. Die Entstehung des Buches	41
XLII. Die Entstehung des Buches	42
XLIII. Die Entstehung des Buches	43
XLIV. Die Entstehung des Buches	44
XLV. Die Entstehung des Buches	45
XLVI. Die Entstehung des Buches	46
XLVII. Die Entstehung des Buches	47
XLVIII. Die Entstehung des Buches	48
XLIX. Die Entstehung des Buches	49
L. Die Entstehung des Buches	50
LI. Die Entstehung des Buches	51
LII. Die Entstehung des Buches	52
LIII. Die Entstehung des Buches	53
LIV. Die Entstehung des Buches	54
LV. Die Entstehung des Buches	55
LVI. Die Entstehung des Buches	56
LVII. Die Entstehung des Buches	57
LVIII. Die Entstehung des Buches	58
LIX. Die Entstehung des Buches	59
LX. Die Entstehung des Buches	60
LXI. Die Entstehung des Buches	61
LXII. Die Entstehung des Buches	62
LXIII. Die Entstehung des Buches	63
LXIV. Die Entstehung des Buches	64
LXV. Die Entstehung des Buches	65
LXVI. Die Entstehung des Buches	66
LXVII. Die Entstehung des Buches	67
LXVIII. Die Entstehung des Buches	68
LXIX. Die Entstehung des Buches	69
LXX. Die Entstehung des Buches	70
LXXI. Die Entstehung des Buches	71
LXXII. Die Entstehung des Buches	72
LXXIII. Die Entstehung des Buches	73
LXXIV. Die Entstehung des Buches	74
LXXV. Die Entstehung des Buches	75
LXXVI. Die Entstehung des Buches	76
LXXVII. Die Entstehung des Buches	77
LXXVIII. Die Entstehung des Buches	78
LXXIX. Die Entstehung des Buches	79
LXXX. Die Entstehung des Buches	80
LXXXI. Die Entstehung des Buches	81
LXXXII. Die Entstehung des Buches	82
LXXXIII. Die Entstehung des Buches	83
LXXXIV. Die Entstehung des Buches	84
LXXXV. Die Entstehung des Buches	85
LXXXVI. Die Entstehung des Buches	86
LXXXVII. Die Entstehung des Buches	87
LXXXVIII. Die Entstehung des Buches	88
LXXXIX. Die Entstehung des Buches	89
LXXXX. Die Entstehung des Buches	90
LXXXXI. Die Entstehung des Buches	91
LXXXXII. Die Entstehung des Buches	92
LXXXXIII. Die Entstehung des Buches	93
LXXXXIV. Die Entstehung des Buches	94
LXXXXV. Die Entstehung des Buches	95
LXXXXVI. Die Entstehung des Buches	96
LXXXXVII. Die Entstehung des Buches	97
LXXXXVIII. Die Entstehung des Buches	98
LXXXXIX. Die Entstehung des Buches	99
LXXXXX. Die Entstehung des Buches	100

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Aufgaben des Intestinaltraktes	1
1.2. Ursachen der Darmhypoxie	2
1.3. Vorkommen der Diaminoxydase	3
1.4. Charakterisierung der Diaminoxydase	5
1.5. Biologische Bedeutung der Diaminoxydase	10
2. Ziel der Arbeit	13
3. Material und Methodik	14
3.1. Material	14
3.1.1. Versuchstiere	14
3.1.2. Gewinnung von Organextrakten zur Bestimmung von DAO-Aktivität, Histidin- und Histaminkonzentrationen	14
3.1.3. Reagenzien	15
3.1.4. Enzyme und Coenzyme	15
3.1.5. Substrate	15
3.2. Methodik	16
3.2.1. Methodische Prinzipien zur Bestimmung der Aktivität der DAO und der Konzentration von Histidin und Histamin	16
3.2.1.1. Bestimmung der DAO-Aktivität	16
3.2.1.1.1. Prinzip des NADH-Testes	18
3.2.1.1.2. Prinzip des Isotopentestes	21
3.2.1.1.3. Prinzip des o-ABA-Testes	21
3.2.1.2. Bestimmung von Histidin- und Histaminkonzentrationen	23
3.2.2. Durchführung der Bestimmung der Aktivität der DAO und Histidin- und Histaminkonzentrationen	25

	Seite
3.2.2.1. Bestimmung der DAO-Aktivität	26
3.2.2.1.1. Bestimmung im NADH-Test	26
3.2.2.1.2. Bestimmung im Isotopentest	29
3.2.2.1.3. Bestimmung im o-ABA-Test	33
3.2.2.2. Fluorometrische Bestimmung von Histi- din- und Histaminkonzentrationen	35
3.2.3. Proteinbestimmung	41
3.2.4. Stabilität der Lösungen	41
3.2.5. Statistische Berechnungen	41
3.2.6. Versuchsmodell zur experimentellen Ischämie am Dünndarm des Hundes	42
4. Ergebnisse	45
4.1. Die Diaminoxydase-Aktivitäten in ver- schiedenem Organen des Hundes	45
4.2. Diaminoxydase-Aktivität, Histidin- und Histaminkonzentration in verschiedenen Abschnitten des Hundedarmes	45
4.3. Reinigung der DAO aus dem Hundedarm	46
4.4. Eigenschaften der DAO aus dem Hundedarm	53
4.4.1. pH-Optimum	53
4.4.2. Hemmstoffe	53
4.4.3. Substratspezifität	54
4.5. Beeinflussung von DAO-Aktivität, Histidin- und Histaminkonzentration und des Protein- gehaltes im Dünndarm des Hundes durch in- testinale Ischämie	65
5. Diskussion	77
5.1. Eigenschaften und Vorkommen der DAO beim Hund	77
5.2. Bedeutung von vasoaktiven Stoffen bei der intestinalen Ischämie	79
5.3. Die DAO als entgiftendes Enzym	84
5.4. Bedeutung der Veränderung von DAO-Aktivi- tät und Histaminkonzentration bei intesti- naler Ischämie	86

	Seite
6. Zusammenfassung	89
7. Literaturverzeichnis	91

1. Einleitung:

1.1. Aufgaben des Intestinaltraktes:

Wenn auch Transport und Resorption von Nahrungsstoffen die Hauptaufgaben des Darmes zu sein scheinen, so stellt darüberhinaus die Darmwand ein Organ dar, das in seiner physiologischen Bedeutung anderen lebenswichtigen Organen, wie Leber oder Niere, gleichkommt. Wie vielfältig insbesondere der Dünndarm in das Gesamtgeschehen im Organismus eingreifen kann, zeigen Ergebnisse aus Biochemie und Physiologie.

Der Darm stellt eine Bildungsstätte von Hormonen dar. Am bekanntesten ist die Produktion von Peptidhormonen, wie Sekretin und Pankreocymin oder auch von Glukagon und anderen vasoaktiven Peptiden. Auch Gewebshormone, wie die biogenen Amine Serotonin und Histamin, kommen im Darm in hohen Konzentrationen vor.

Als Ursprungsort von Immunglobulin des Typs Ig A gewinnt der Intestinaltrakt bei Erkrankungen, wie z. B. bei Morbus Crohn, zunehmende Bedeutung.

Durch den hohen Gehalt der Darmwand an verschiedenen Enzymen, wie z. B. an Aminoxydasen, kann der Darm bei pathologischen Prozessen durch Inaktivierung von toxischen Substanzen eine wichtige Entgiftungsfunktion erfüllen.

Das Gefäßsystem des Darmes kann, ebenfalls unter pathologischen Verhältnissen, aufgrund seiner Blutspeicherkapazität zur Stabilisierung des Gesamtkreislaufes beitragen.

Die Bedeutung, die der Organismus dem Organ Darm einräumt, geht aus dessen Durchblutungsrate und intensiver Innervation hervor. Unter normalen Bedingungen erhält das Splanchnikusgebiet 28 % des gesamten Herzminutenvolumens. 58 % davon, also 16 % des Herzminutenvolumens, fließen durch die Arteria mesenterica superior.

Die Innervation des Intestinaltraktes beansprucht nicht nur einen Großteil des Nervus vagus, auffällig ist auch die starke adrenerge Innervation, wobei α -adrenerge Fasern, deren Reizung Vasokonstriktion bewirkt, weitaus überwiegen.

Diese Besonderheiten, nämlich die hohe Durchblutungsrate und die starke Innervation und somit die Anfälligkeit für reflektorisches Geschehen sowie der hohe Sauerstoffbedarf des Darmepithels, begründen die rasche Entwicklung einer Darmhypoxie bei Zuständen mit Minderdurchblutung verschiedenster Ursache.

1.2. Ursachen der Darmhypoxie:

Außer dem Mesenterialarterienverschluß durch Embolie oder Thrombose, der in der Klinik das dramatischste Ereignis einer Darmhypoxie darstellt, finden sich noch zahlreiche andere lokale und generalisierte Ursachen für Sauerstoffmangelzustände der Darmwand.

Ein akuter Verschluß von Mesenterialvenen, insbesondere der Pfortader, führt ebenso wie der arterielle Verschluß zum haemorrhagischen Darminfarkt.

Im Rahmen des Ileusgeschehens folgen die pathophysiologischen Prozesse beim Strangulationsileus denjenigen eines reinen Gefäßverschlusses. Anders verlaufen dagegen die Mechanismen der Entstehung einer Darmwandhypoxie bei verschiedenen Formen des mechanischen oder beim paralytischen Ileus. Hierbei kommt es infolge der Überdehnung der Darmwand erst zu einer Behinderung des venösen Abflusses, damit zum interstitiellen Ödem und einem weiteren Anstieg des Gewebsinnendruckes, der schließlich auch die arterielle Blutzufuhr behindert.

Langdauernde Hypotensionen, die meist unter dem Erscheinungsbild eines Schockzustandes auftreten, können ebenfalls zur Darmhypoxie führen. Als Ursache kommen z. B. bakterielle oder durch Pharmaka bedingte Intoxikationen sowie schwere Haemorrhagien infrage.

Bedingt durch eine Minderdurchblutung im Splanchnikusgebiet, in deren Folge eine Hypoxie auftritt, kommt es zur Zerreißung von Zellen und deren einzelnen Bestandteilen und deren Folge zu einem Freiwerden von lysosomalen Proteasen und Hydrolasen (TRIER, 1965). Diese lysosomalen Hydrolasen und Proteasen wiederum sind für die Entstehung und Bildung von vasoaktiv wirkenden Peptiden verantwortlich. Aber auch andere Enzyme, wie die GOT (MAVOR, 1961) und die Amylase, treten nach Darmhypoxie vermehrt im Serum auf. Im Tierexperiment fanden RUSH et al. (1972) bei intestinaler Ischämie in der Peritonealflüssigkeit eine Erhöhung der LDH von 18,2 auf 228 U/ml sowie der Aldolase von 2,0 auf 16,3 U/ml.

Im Zusammenhang mit diesen enzymatischen Veränderungen mußte die Frage gestellt werden, ob nicht durch eine Darmhypoxie auch die Aktivität von Enzymen verändert wird, deren Vorkommen für den Darm charakteristisch ist. Die Diaminoxydase, ein Enzym, das den oxydativen Abbau von biogenen Aminen katalysiert, kommt beim Hund vor allem auch im Gastrointestinaltrakt vor, so daß angenommen werden konnte, daß ischämiebedingte Veränderungen der Aktivität dieses Enzyms Aufschluß geben könnten über pathophysiologische Prozesse, die bei diesem Krankheitsbild in der Darmwand ablaufen.

1.3. Vorkommen der Diaminoxydase (DAO):

Aufgrund der Fähigkeit von Lungengewebe, Histamin zu inaktivieren, beschrieb BEST (1929) ein Enzym, das Histaminase genannt wurde. ZELLER wies 1938 nach, daß das Enzym der Schweineniere neben Histamin auch aliphatische Diamine, wie Putrescin und Cadaverin sowie Agmatin, oxydativ desaminierte. Er nannte das Enzym deshalb Diaminoxydase. Histamin kann bei dieser Betrachtungsweise als ringförmiges Diamin aufgefaßt werden. In der internationalen Nomenklatur findet sich das Enzym als Diamine : oxygen oxidoreductase (deami-

nating) EC 1.4.3.6. eingereiht (Report of the commission on enzymes of the IUB). Die Frage, ob Diaminoxydase und Histaminase identische Enzyme seien, war lange Zeit umstritten. KAPPELLER-ADLER (1956) glaubte an das Vorliegen verschiedener Aminoxydasen mit hoher Substratspezifität; z. B. Cadaverinase, Putrescinase und Histaminase. Andere Autoren (ZELLER, 1963) dagegen waren der Meinung, dies seien Eigenschaften ein- und desselben Enzyms. Eine spezifische Histaminase konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden. Die synonyme Verwendung der Bezeichnungen Diaminoxydase und Histaminase hat sich weitgehend durchgesetzt. Es ist wahrscheinlich, daß Diaminoxidasen verschiedener Herkunft nicht identisch sind, sondern eine Gruppe von homologen Enzymen mit teilweiser sehr unterschiedlicher Substratspezifität darstellen (LORENZ et al., 1969 a + b).

Diaminoxidasen sind in der Natur weit verbreitet. Sie kommen bei Bakterien (WERLE, 1941), Pilzen (WERLE, 1941) und höheren Pflanzen, insbesondere bei Leguminosen (WERLE und PECHMANN, 1949) vor. Bei Säugetieren und Menschen werden unterschiedlich hohe Diaminoxydase-Konzentrationen gefunden (ZELLER, 1951). Besonders hohe Aktivitäten des Enzyms werden in Organen gefunden, die eine starke Blutversorgung haben, wie Niere (LINDELL, 1958; LINDAHL, 1957; WATON, 1956; BEST et al., 1930), Darmschleimhaut (WATON, 1956; KOBAYASHI et al., 1958, 1959), Leber (ZELLER et al., 1958; SHORE et al., 1960) und Lunge (ZELLER et al., 1958; BEST et al., 1930; WATON, 1956). In der Lymphe des Darmes (CARLSTEN, 1950; GESSLER et al., 1956) wurde ebenfalls Diaminoxydase nachgewiesen. Die Plazenta verschiedener Spezies, besonders jedoch des Menschen, wies ebenfalls hohe Diaminoxydase-Konzentrationen auf (ZELLER, 1951; KAPPELLER-ADLER, 1960; DANFORTH et al., 1937).

1.4. Charakterisierung der Diaminoxydase:

Die Diaminoxydase ist ein lösliches Enzym, das hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist (KAPELLER-ADLER, 1970). In der Niere werden 10 % der gesamten Diaminoxydase-Aktivität in der Mitochondrienfraktion nachgewiesen (ZELLER, 1956). In der Kaninchenleber ist die Diaminoxydase nach Angaben von COTZIAS und DOLE (1952) ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert. Da das Enzym nach Homogenisierung von Organen sehr gut in Lösung erhältlich ist und sich außerdem durch eine hohe Stabilität auszeichnet, war das Enzym relativ leicht zu reinigen. Aus Schweineniere, die unter allen tierischen Geweben die beste Enzymquelle darstellt, wurde die Diaminoxydase vielfach angereichert (TABOR, 1951; KAPELLER-ADLER und MAC FARLANE, 1963; MONDOVI et al., 1964; GORYACHENKOVA et al., 1958) und sogar kristallisiert (EDLBACHER und ZELLER, 1937). Ferner wurde das Enzym aus dem Hundedarm (KUSCHE et al., 1973b) und dem Kaninchendarm (KUSCHE et al., 1974) angereichert. Der optimale pH-Bereich für das tierische Enzym erstreckt sich mit Cadaverin als Substrat von pH 6,8 - 7,6 (ZELLER, 1951). BLASCHKO et al. (1959) fanden für das Enzym der Schweineniere ein pH-Optimum von 6,3, wenn Histamin als Substrat benutzt wurde, wohingegen der Abbau von Cadaverin beim gleichen pH deutlich geringer war. Ebenfalls mit Histamin als Substrat fanden KAPELLER-ADLER und MAC FARLANE (1963) für die Diaminoxydase der Schweineniere ein pH-Optimum von 6,8. Einen optimalen pH-Bereich von 7,2 - 7,7 mit Putrescin als Substrat fanden KUSCHE et al. (1973b) für das Enzym des Hundedarmes.

Die optimale Substratkonzentration wird für Histamin bei etwa $10^{-3}M$ und für Putrescin und Cadaverin bei $2 \times 10^{-3}M$ erreicht (SINCLAIR, 1952). KAPELLER-ADLER und MAC FARLANE

(1963) beschrieben eine optimale Substratkonzentration von $2,72 - 5,44 \times 10^{-3} M$ für Histamin. Für Putrescin erwies sich für die Hundedarmdiaminoxydase eine Endkonzentration von 1 mM als optimal. Ebenso wie in der Untersuchung von KAPPELLER-ADLER und MAC FARLANE (1963) wurde durch eine supraoptimale Substratkonzentration die Diaminoxydase im zunehmenden Maße gehemmt.

Die Frage nach den Cofaktoren des Enzyms war Anlaß zu zahlreichen Untersuchungen. ZELLER (1938 a + b) war der Meinung, daß die Bildung von Wasserstoffperoxyd bei der Enzymreaktion ein Hinweis dafür sei, daß Flavin-adenin-dinucleotid in der prosthetischen Gruppe beteiligt sei.

Aufgrund der Hemmbarkeit der Diaminoxydase durch Carbonyl-Reagentien (ZELLER, 1942) reihte man das Enzym unter die Pyridoxal-Phosphat-Enzyme ein (DAVISON, 1956). Diese Ansicht wurde weiter gestützt durch die Abnahme der Diaminoxydase-Aktivität in der Lunge und in der Darmschleimhaut von Ratten, die mit einer Vitamin B_6 - und B_2 -Mangeldiät gefüttert wurden (GORYACHENKOVA, 1956b). Spektrophotometrische Untersuchungen von KAPPELLER-ADLER und MAC FARLANE (1963) und von MONDOVI et al. (1964) wiesen ebenfalls auf das Vorhandensein von Pyridoxal-Phosphat in der Diaminoxydase der Schweineniere hin. Andererseits wurde bei Versuchen zur Reinigung der Schweinenieren-Diaminoxydase festgestellt, daß durch Dialyse inaktiviertes Enzym sich durch den Zusatz von Flavin-adenin-dinucleotid reaktivieren ließ. Aus Präparaten von gereinigter Diaminoxydase konnten bisher jedoch weder Pyridoxalphosphat noch Flavin-adenin-dinucleotid als prosthetische Gruppe isoliert werden.

Wesentlich gesicherter erscheint die Gegenwart von Kupfer im Enzymprotein der Diaminoxydase (MONDOVI et al., 1967) zu sein. Sie wiesen mit Hilfe der Atomabsorption- und der

electron-paramagnetic-resonance (EPR)-Spektroskopie das Vorhandensein von 11 - 12 μmol zweiwertiges Kupfer/mg Protein in der hochgereinigten Diaminoxydase der Schweineniere nach. Bemerkenswert ist, daß Kupfer der Diaminoxydase im Gegensatz zu dem anderer kupferhaltiger Oxydasen (z. B. Zytochromoxydase) in Gegenwart von Substratüberschuß nicht reduziert wird.

Von den Hemmstoffen der Diaminoxydase wurden die Carbonyl-Reagentien bereits kurz erwähnt. Zu dieser Gruppe gehören Hydroxylamin (ZELLER et al., 1939; ROULET et al., 1945; ARUNSLAKSHANA et al., 1954), Hydrazine und Hydrazinderivate (SCHULER, 1952; BLASCHKO et al., 1959), Semicarbacid (ZELLER, 1938a; ARUNSLAKSHANA et al., 1954) und als basischer Hemmstoff Aminoguanidin (BLASCHKO, 1949; BLASCHKO et al., 1959; ZELLER, 1938b; WATON, 1956; FOUTS et al., 1957; SCHULER, 1952). Weitere Diaminoxydase-Inhibitoren sind, um nur die wichtigsten noch zu nennen, Cyanide (ZELLER, 1940) und langkettige Diamine (GORJACHENKOVA, 1956a).

Die hauptsächlich untersuchten und benutzten Inhibitoren hemmen die Aktivität der Diaminoxydase im allgemeinen bei Konzentrationen von 10^{-5} - 10^{-7} M. Alle diese Substanzen haben keinen hemmenden Einfluß auf die Monoaminoxydase (ZELLER, 1963), andererseits ist cis- und trans-2-Phe-nylcyclopropylamin, das ein sicherer Monoaminoxydase-Hemmstoff ist (ZELLER, 1963), ohne eine Wirkung auf die Diaminoxydase der Schweineniere (SARKAR et al., 1960) oder Meer-schweinchenleber (SHORE und COHN, 1960).

Die Tatsache, daß einige Hydrazinderivate sowohl die Diaminoxydase als auch die Monoaminoxydase hemmen können, ist kein Argument für die Ähnlichkeit beider Enzyme, da der Reaktionsmechanismus der zwei Enzymaktivitäten stark variiert (GREEN, 1962; GREEN, 1964). Alle Guanidinderivate sind

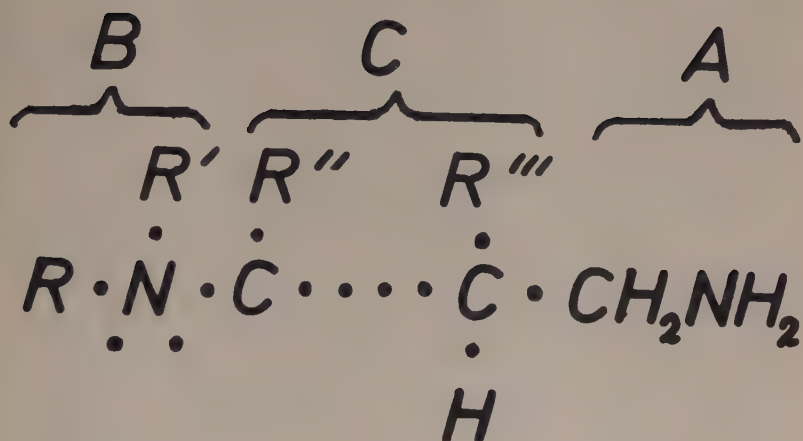
kompetetive Hemmstoffe der Schweinenieren-Diaminoxidase. In einer Konzentration von 5×10^{-8} M inaktiviert Amino-guanidin die Diaminoxidase zu 50 % (SCHULER, 1952). In einer Konzentration von $4,5 \times 10^{-8}$ M wurde die Diaminoxidase des Hundedarmes (KUSCHE et al., 1973b) zu 50 % gehemmt.

Es gibt keine Abhängigkeit der Stärke der Diaminoxidase-Hemmstoffe bei in vivo- und in vitro-Versuchen (BURKARD, 1960).

Einige der Diamidine verursachen durch Histaminfreisetzung aus dem Gewebe einen Anstieg des biogenenamins im Blut (MACINTOSH et al., 1949; BERGERET et al., 1957), wobei ein Teil dieser Substanzen als Hemmstoffe der Diaminoxidase bekannt sind. Jedoch besteht keine Parallelität zwischen der Diaminoxidase-Hemmung und der Histamin-Liberierung in vivo (BURKARD, 1960).

Durch Versuche mit Präparaten der Schweinenieren-Diaminoxidase in Gegenwart verschiedener Substrate stellten ZELLER et al. (1956) fest, daß am aktiven Zentrum der Diaminoxidase zwei Typen von Rezeptoren vorhanden sind (siehe Schema 1, Seite 9).

1. Der Rezeptor (B) der Substratbindungsseite, der nach BARDSLEY und HILL (1970) wahrscheinlich eine negative Ladung darstellt. Dies stimmt überein mit der Tatsache, daß die Diaminoxidase ihr pH-Optimum in einem Bereich hat, in dem die Diamine in dikationischer Form vorliegen, und
2. der Rezeptor (A), an dem die Substratumwandlung und schließlich die Ammoniakabspaltung stattfindet. Hier können nur terminale und unsubstituierte Aminogruppen reagieren.



Schema 1:

Schema eines spezifischen Diaminoxydase-Substrates (ZELLER et al., 1956).

R = H oder organischer Rest

A, B = Substratbindungsstellen

C = Abstand der beiden Substratbindungsstellen

An der Substratbindungsseite ist dagegen eine Reaktion auch nach N-Substitution noch möglich. Die beiden unterschiedlichen Rezeptoren erklären, daß 1. durch die Einwirkung der Diaminoxidase nur eine Aminogruppe eines einfachen aliphatischen Diamins in Form von Ammoniak abgetrennt wird und, daß 2. die enzymatische Abbaugeschwindigkeit eines aliphatischen Diamins von der Kettenlänge abhängt, die den Abstand der basischen Gruppen definiert.

1.5. Biologische Bedeutung der Diaminoxidase:

Die Diaminoxidase steht mit ihren Substraten Histamin, Putrescin und Cadaverin und Inhibitoren mit einer großen Zahl von Stoffwechselvorgängen und Organfunktionen in enger Beziehung. Die Analyse der im Urin ausgeschiedenen Abbauprodukte des Histamins zeigt, daß sowohl Histaminase als auch N-Methyl-Transferase hauptsächlich für den Stoffwechsel des exogenen Histamins bei verschiedenen Spezies verantwortlich sind (SCHAYER, 1959). Die oxydativen Abbauprodukte des Histamins, Imidazolessigsäure und Methylimidazolessigsäure, stellen 60 - 80 % der im Urin ausgeschiedenen Metaboliten bei Ratte, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen, Katze, Hund und Mensch dar (SCHAYER, 1959, 1966). Die Bedeutung der Histaminase im Stoffwechsel des Methylhistamins in vivo ist noch unsicher, obwohl in vitro ein Abbau durch Diaminoxidase erfolgt (KAPELLER-ADLER, 1965b).

Die hohe Konzentration von Diaminoxidase in Geweben mit starker Blutversorgung deutet auf die Rolle des Enzyms im Histaminstoffwechsel in diesen Geweben hin. Von besonderem Interesse ist die hohe Enzymaktivität in der Darmmucosa (BURKARD, 1954; VALETTE et al., 1956), die mit der ebenfalls hohen Aktivität in der Leber verhindert, daß zu große Mengen von Histamin durch den Darm absorbiert werden und in den Kreislauf gelangen. Bei Schafen hat z. B. das Rumen einen

großen Histamingehalt. Die nachgeschaltete Leber mit ihrer ausgeprägten Diaminoxidase-Aktivität verhindert durch den Histaminabbau, daß zu viel des biogenen Amins in den Kreislauf gelangt (SJAASTAD et al., 1963). Die toxische Wirkung von Histamin ist geringer, wenn es per os und nicht intravenös verabreicht wird (BOVET et al., 1948).

Die hohe Enzymaktivität der Plazenta stimmt ebenfalls mit der Tatsache überein, daß die Diaminoxidase besonders in den Geweben mit reicher Blutversorgung vorkommt. LINDBERG u. Mitarb. (1963b) konnten zeigen, daß nur geringe Mengen von ^{14}C -Histamin unverändert die Plazenta von schwangeren Frauen passieren können. Die reiche Diaminoxidase-Aktivität der Plazenta und des Blutes schwangerer Frauen kann die Mutter vor dem im fetalen Gewebe produzierten (LINDBERG et al., 1963c) oder durch Ruptur der uterinen Mastzellen freierwerden Histamin (SZEGO, 1964) schützen. In Übereinstimmung mit diesen Befunden fand LINDBERG (1963a), daß nach Injektion von ^{14}C -Histamin die Aktivität des Histamins im Blut von Schwangeren um 50 % niedriger als bei Nichtschwangeren war.

Bei der Zusammenfassung der Organe, die die höchste Diaminoxidase-Aktivität im Säugerorganismus entwickeln, dies sind Niere, Darm und Plazenta, fällt auf, daß es sich um Organe handelt, die in der Lage sind, Histamin sehr rasch aus der Blutbahn zu eliminieren. Eine wesentliche Funktion der Diaminoxidase besteht also

1. in der Unterbindung der Wirkung von exogenem Histamin, das möglicherweise über den Darmtrakt oder durch Histaminbildung des Feten in den Organismus gelangen könnte - Darm und Plazenta erfüllen diese Bedingungen - und
2. in der Unterbindung der Wirksamkeit von endogenem Histamin, das in die Blutbahn gerät, eine Aufgabe, die der Niere zufällt.

In diese Hypothese paßt ferner das Fehlen von Diaminoxydase in Organen, deren Funktion unmittelbar mit dem Umsatz von Histamin verknüpft ist, z. B. in der Magenschleimhaut (KOBAYASHI et al., 1958; KOBAYASHI et al., 1959). Hier greift die Histamin-N-Methyltransferase ein (BROWN et al., 1959), ein Enzym, das darauf spezialisiert zu sein scheint, die endogene Histaminkonzentration am Wirkungsort zu steuern, oder jenes Histamin, das aus Histaminspeichern zur Übernahme einer Funktion freigesetzt wird, z. B. zur Sekretionsstimulierung in der Mukosa des Magens.

Vereinfacht ausgedrückt, besteht die Aufgabe der Diaminoxydase in einer Inaktivierung von nicht oder nicht mehr benötigtem, daher für den Organismus gefährlichen Histamin, während die Histamin-Methyltransferase die funktionell benötigte Histaminkonzentration am Wirkungsort begrenzt.

2. Ziel der Arbeit:

Angeregt durch das spezifische Vorkommen der Diaminoxydase im Gastrointestinaltrakt, insbesondere im Dünndarm, war das Ziel der Arbeit, zur Klärung der biologischen Funktion des Enzyms in der Darmwand beizutragen. Dieses Ziel sollte auf zwei Wegen angestrebt werden:

1. Die Reinigung des Enzyms bot die Möglichkeit, dessen Eigenschaften zu untersuchen. Aufgrund der Eigenschaften der Diaminoxydase konnte dann auf deren Möglichkeit z. B. in den Stoffwechsel von vasoaktiven biogenen Aminen einzugreifen, geschlossen werden.
2. Um zu Erkenntnissen über die Bedeutung der Diaminoxydase in vivo zu gelangen, stellte die intestinale Ischämie das geeignete Versuchsmodell dar, da die Ischämie wohl der schwerste Eingriff in das Stoffwechselgeschehen eines Organes ist und somit deutliche Veränderungen von biologischen Parametern zu erwarten sind.
Biochemische Untersuchungen in vitro und tierexperimentelle Studien sollten sich also ergänzen zur Gewinnung von Ergebnissen über die Bedeutung der Diaminoxydase des Dünndarmes bei experimenteller intestinaler Ischämie.

3. Material und Methodik:

3.1. Material:

3.1.1. Versuchstiere:

Für die Versuche wurden Bastardhunde beiderlei Geschlechts mit einem Durchschnittsalter von 2 - 4 Jahren verwendet. Das Gewicht betrug für die weiblichen Hunde $14,6 \pm 1,5$ kg, für die männlichen $15,5 \pm 1,4$ kg. Die Hunde wurden vor Versuchsbeginn 4 Wochen eingewöhnt und auf ihren Gesundheitszustand beobachtet. Die Ernährung erfolgte mit Mischfutter Altromin^R und Wasser ad libitum.

3.1.2. Gewinnung von Organextrakten zur Bestimmung von Diaminoxidase-Aktivität, Histidin- und Histamin-Konzentration:

Das Organmaterial wurde in Pentobarbitalnarkose (Nembutal^R) (25 mg/kg i.v.) entnommen und möglichst rasch tiefgekühlt (-20°C). Die Weiterverarbeitung des Gewebematerials erfolgte bei $0 - 4^{\circ}\text{C}$ durch Homogenisieren mit 3 Teilen 0,2 M Natrium-Kalium-Phosphatpuffer pH 7,4 und anschließendem Zentrifugieren für 30 Minuten bei 48 000 g. Der Überstand konnte im o-Aminobenzaldehyd-Test und im Isotopentest als Enzympräparat eingesetzt werden.

Zur kombinierten Bestimmung von Histidin- und Histamin-Konzentrationen in einer Gewebeprobe (J. KUSCHE und W. LORENZ, 1971) wurden die Organproben 1 : 1,3 (w/v) mit 3,8 % Trichloressigsäure versetzt, homogenisiert und 10 min. bei 1 800 g zentrifugiert. Vom Überstand wurde 1,0 ml in 3,0 ml 0,05 M Natrium-Phosphatpuffer pH 5,5 aufgenommen und mit 1 N NaOH auf pH 5,5 eingestellt. Dieser Organextrakt konnte zur fluorometrischen Histidin- und Histaminbestimmung verwendet werden.

3.1.3. Reagenzien:

2-Aminobenzaldehyd, purum (Fluka); o-Phthaldialdehyd, purissimum (Fluka), rekristallisiert aus Petroläther (LORENZ et al., 1971); Methanol, Uvasol (Merck); Toluol, p.a. (Merck); 2,5-Diphenyloxazol (PPO), p.a. (Merck); Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), p.a. (Merck); Dinatriumhydrogenphosphatmonohydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), p.a. (Merck); Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO_3), p.a. (Merck); Perchlorsäure (HClO_4) 70 %, p.a. (Merck); Trichloressigsäure, p.a. (Merck); Natriumhydroxid (NaOH), p.a. (Merck); Salzsäure (HCl) 32 %, p.a. (Merck); ortho-Phosphorsäure (H_2PO_4) 98 %, p.a. (Merck).
Gele und Harze zur Säulenchromatographie:
Sephadex G 50, fine, Sephadex G 200, superfine (beide Pharmacia); Dowex 50 W - X8, H^+ , mesh 200 - 400 (Serva), DEAE-Cellulose (p.a., Kapazität 0,7 mÄq/g, mesh 50 - 200, Serva).

3.1.4. Enzyme und Coenzyme:

Glutamatdehydrogenase (GLDH-S) aus Rinderleber, Lösung in 50 % Glycerin, 45 U/mg, frei von Ammoniak (Boehringer, Mannheim); Diaminoxydase aus Hundedarm angereichert (s. Kap. 3.1.2.); β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH-Na_2) als Dinatriumsalz (Boehringer, Mannheim).

3.1.5. Substrate:

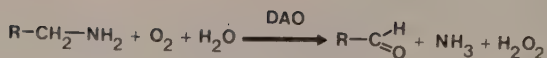
Histamin-dihydrochlorid, purum (Fluka); Histidin-dihydrochlorid, purum (Fluka); Cadaverin-dihydrochlorid, purum (Fluka); Putrescin-dihydrochlorid, purum (Fluka); Putrescin-1,4- ^{14}C -dihydrochlorid (The Radiochemical Center, Amersham), spez. Aktivität: 17,8 mCi/mMol; α -Keto-glutarsäure, kristallisiert, 98 % (Boehringer, Mannheim).

3.2. Methodik:

3.2.1. Methodische Prinzipien zur Bestimmung der Aktivität der Diaminoxydase und der Konzentration von Histidin und Histamin:

3.2.1.1. Bestimmung der Diaminoxydase-Aktivität:

Die oxydative Desaminierung von Diaminen, aber auch von einigen Monoaminen, durch die Diaminoxydase erfolgt nach ZELLER (1942) nach dem in der Abb. 1 allgemein formulierten Reaktionsschema:



Gleichung 1

Die Diaminoxydase-Aktivität kann aufgrund dieser Gleichung bestimmt werden:

1. Durch die Bestimmung des Substratverbrauches, was besonders bei der Verwendung von Histamin als Substrat häufig angewandt wurde,
2. anhand der manometrischen Messung des O_2 -Verbrauches,
3. anhand der gebildeten Reaktionsprodukte.

Dies ist sowohl für den Aldehyd als auch für H_2O_2 und NH_3 (LORENZ et al., 1968) möglich.

①



②

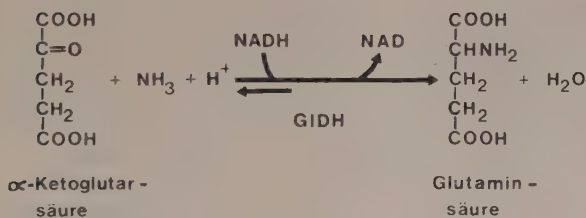


Abb. 1:

Schema der Diaminoxidasereaktion (1) (ZELLER, 1942) und der Erfassung des entstehenden Ammoniaks durch die Indikatorreaktion (2) (KIRSTEN, 1963).

DAO - Diaminoxydase

GLDH - Glutamatdehydrogenase

Das Prinzip der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bestimmungsmethoden läßt sich an der Bruttogleichung der Diaminoxidasereaktion mit Putrescin (1,4-Diaminobutan), einem ihrer besten und daher am häufigsten eingesetzten Substrate, erklären (Abb. 3 u. 4).

Zur Bestimmung der Diaminoxydase wurden drei verschiedene Verfahren angewandt. Zwei davon, der o-Aminobenzaldehydtest und der Isotopentest, eigneten sich besonders zur Bestimmung der Diaminoxydase-Aktivität in Rohextrakten, der NADH-Test wurde dagegen besonders zur Untersuchung der Eigenschaften der Diaminoxydase in gereinigten Enzympräparaten verwendet.

3.2.1.1.1. Prinzip des NADH-Testes:

Das Prinzip dieser Methode wurde erstmals von KIRSTEN et al. (1963) bei der Bestimmung von NH_4^+ mit Hilfe der Glutamatdehydrogenasereaktion GLDH, (L-glutamate: NAD oxidoreductase (deaminating) EC 1.4.1.2. angewandt. Im gekoppelten optischen Test (LORENZ et al., 1967; LORENZ et al., 1969 a + b; LORENZ et al., 1970b) zur Bestimmung der DAO-Aktivität dient die Glutamatdehydrogenase als Indikatorenzym. Entsprechend dem breiten pH-Optimum der GLDH können die Messungen in einem Bereich von 7,2 - 8,5 bei optimaler Geschwindigkeit der Indikatorreaktion durchgeführt werden.

Das bei der Reaktion der Diaminoxydase (Abb. 1, Gleichung 1) entstehende Ammoniumion durchläuft die Indikatorreaktion (Abb. 1, Gleichung 2). Das Gleichgewicht der Diaminoxydase-reaktion liegt ganz auf der Seite der Reaktionsprodukte. Eine Rückreaktion konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der Gleichgewichtslage der Indikatorreaktion (STRECKER, 1955) kann das entstehende Ammoniak praktisch vollständig umgesetzt werden.

$$K = \frac{[\alpha\text{-Ketoglutarat}] \cdot [\text{NH}_3] \cdot [\text{NADH}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{Glutamat}] \cdot [\text{NAD}^+] \cdot [\text{H}_2\text{O}]} = 1.8 \cdot 10^{-13}$$

Da 1 Mol umgesetztes NADH gleich der Menge von 1 Mol freigesetztem NH_4^+ ist, ist der NADH-Verbrauch ein Maß für die Aktivität der Diaminoxydase.

Grundlagen des UV-Testes:

Die Grundlage des optischen Testes nach WARBURG (1936) ist die Lichtabsorption des an der Reaktion beteiligten Coenzym. Man benutzt die Absorption des reduzierten Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) bei einer Wellenlänge von 334, 340 oder 366 nm zur Messung (Abb. 2). Da NAD^+ im Wellenlängenbereich 300 - 400 nm eine wesentlich geringere Absorption zeigt, kann die Aktivität von Dehydrogenasen (hier der GLDH), deren Coenzym NADH bzw. NAD^+ ist, durch die entstehenden Extinktionsunterschiede bei 344, 340 oder 366 nm photometrisch bestimmt werden. Der molare Extinktionskoeffizient E, der die Extinktion einer 1 molaren Lösung bei einer Schichtdicke von 10,00 mm wiedergibt, hat für NADH bei den verschiedenen Wellenlängen die folgenden Werte:

$$\begin{aligned} 334 \text{ nm} &= 6,0 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{Mol} \\ 340 \text{ nm} &= 6,2 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{Mol} \\ 366 \text{ nm} &= 3,3 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{Mol} \end{aligned}$$

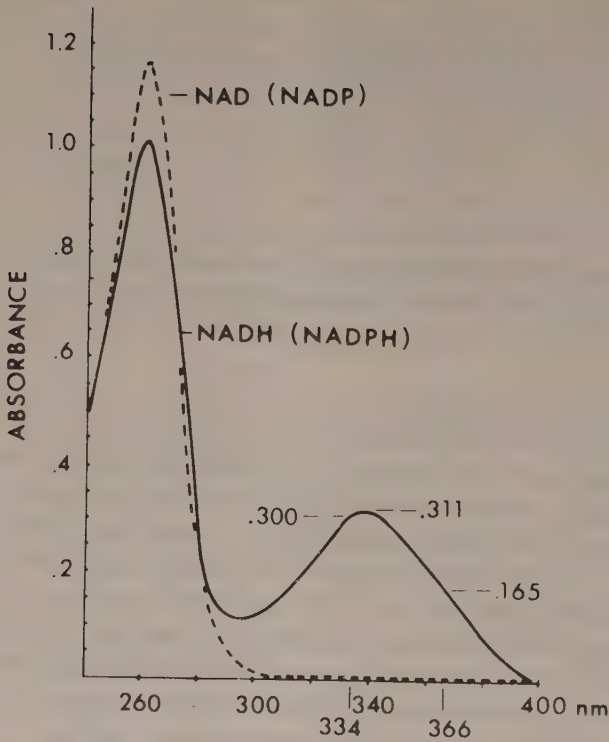


Figure 2

Absorption spectra of nicotinamide-adenine-dinucleotides.

Abb. 2:

Absorptionsspektren von Nicotinamid-adenin-dinucleotiden (nach BERGMEIER, 1970).

3.2.1.1.2. Prinzip des Isotopentestes:

In C_1 und C_4 radioaktiv markiertes Putrescin wurde nach OKUYAMA und KOBAYASHI (1961) zur Messung der Diaminoxidase-Aktivität im Isotopentest eingesetzt. Es kann auch $1,5-^{14}C$ -Diaminopentan verwendet werden. Dieser Test brachte die beachtlichen Vorteile der Empfindlichkeit und einfachen Durchführbarkeit mit sich (KUSCHE et al., 1973a). Das Prinzip des Isotopentestes beruht auf der raschen spontanen Cyclisierung des Reaktionsproduktes des durch Diaminoxidase katalysierten Abbaues von Putrescin: γ -Aminobutyraldehyd (Abb. 3). Die Cyclisierungsreaktion verläuft quantitativ. Es bilden sich Δ_1 -Pyrrolin oder seine Polymere. Da das Diamin Putrescin gut wasserlöslich ist, für die cyclisierte Verbindung dagegen organische Flüssigkeiten gute Lösungsmittel sind, können radioaktiviertes Substrat und Produkt durch Extraktion der cyclischen Verbindungen in Toluol getrennt werden. Die Menge der Radioaktivität, die von der wässrigen in die organische Phase überführt wurde, ist ein Maß für die Diaminoxidase-Aktivität.

3.2.1.1.3. Prinzip des o-Aminobenzaldehyd-Testes:

Der von HOLMSTEDT und THAM (1959) und HOLMSTEDT u. Mitarb. (1961) angegebene Test ermöglicht auf einfache Weise die Messung der Diaminoxidase-Aktivität. Diese Bestimmungsmethode der DAO-Aktivität basiert ebenso wie der Isotopentest auf der spontanen Cyclisierung der Reaktionsprodukte der Diaminoxidasereaktion mit den beiden Substraten Putrescin und Cadaverin. Die Cyclisierungsprodukte Δ_1 -Pyrrolin und Δ_1 -Piperidin kondensieren mit o-Aminobenzaldehyd zu einem Komplex von intensiver Gelbfärbung (TABOR, 1951). Die Stärke der Lichtabsorption des Farbstoffes, die bei 340 nm gemessen wird, bildet ein Maß für die Diaminoxidase-Aktivität.

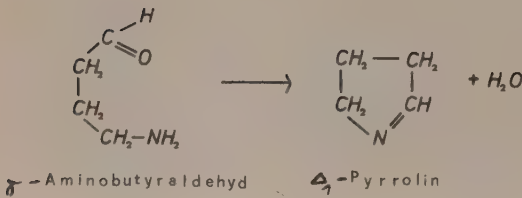
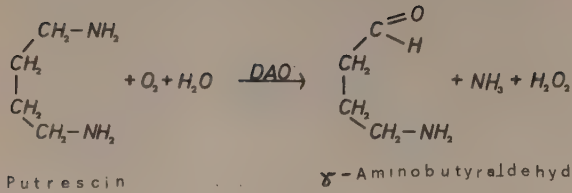


Abb. 3:

Reaktionsschema der Diaminoxidase (DAO) mit Putrescin (1) als Substrat und Cyclisierung des entstandenen γ -Aminobutyraldehyds zu Δ_1 -Pyrrolin (2).

Die Entstehung des Farbstoffkomplexes erfolgt nach SCHÖPF und OESCHLER (1936) und TABOR (1951), wahrscheinlich nach dem in der Abb. 4 dargestellten Reaktionsmechanismus.

3.2.1.2. Bestimmung von Histidin- und Histaminkonzentrationen:

Insbesondere zur Bestimmung von Histidin in menschlichem Serum oder Plasma, d. h. in Körperflüssigkeiten, wo eine Störung der Messungen durch gleichzeitig vorliegendes Histamin nicht zu erwarten war, wurde die fluorometrische Bestimmung von Histidin eingesetzt (PISANO et al., 1961; GERBER, 1970; AMBROSE et al., 1969). In Anlehnung an die fluorometrische Bestimmung von Histamin nach Kopplung mit o-Phthaldialdehyd (SHORE et al., 1959) wurde von PISANO et al., (1961) der fluorometrische Test für Histidin beschrieben. Bei diesem Verfahren wird vor der fluorometrischen Bestimmung Histidin aus Organextrakten durch Chromatographie an Dowex 50 isoliert. Dieser Schritt ist deshalb von so großer Bedeutung, weil er die Spezifität des Histidintestes gewährleistet und z. B. eine Bestimmung der Aminosäure bei gleichzeitigem Vorliegen des Amins in der gleichen Organprobe ermöglicht.

Die durch Ionenaustauscher-Chromatographie isolierte Aminosäure wird im alkalischen Milieu mit o-Phthaldialdehyd gekoppelt. Die entstandene fluoreszierende Verbindung wird im sauren Milieu stabilisiert und kann im Fluorometer bestimmt werden.

Die fluorometrische Bestimmung von Histamin nach Kationenaustauscher-Chromatographie (LORENZ et al., 1970a) erfolgt nach dem gleichen Prinzip.

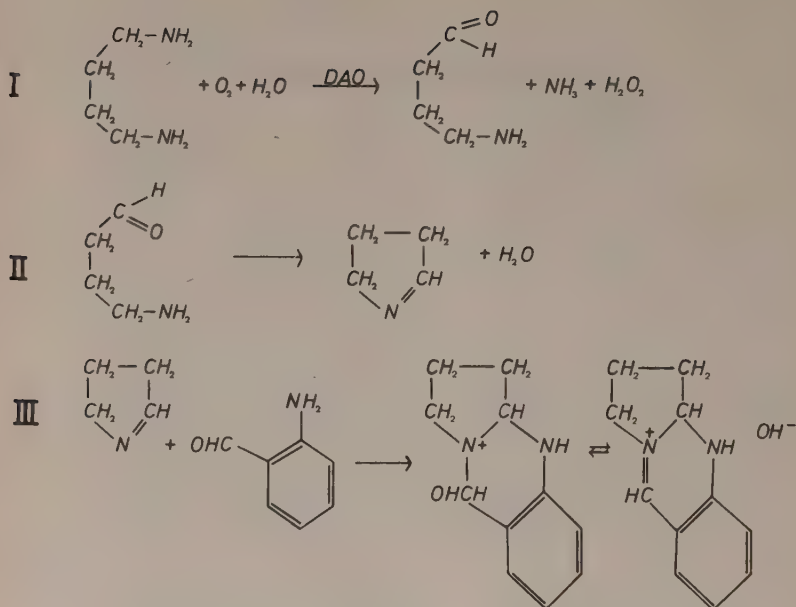


Abb. 4:

Oxydative Desaminierung von Putrescin durch Diaminoxydase (DAO) (I), Cyclisierung des Reaktionsproduktes (II) und Bildung eines Farbstoffkomplexes mit o-Aminobenzaldehyd (III) nach SCHÖPF und ÖSCHLER (1936) und TABOR (1951).

Bei der gleichzeitigen Bestimmung von Histidin und Histamin aus einer Organprobe wird die unterschiedlich starke Bindung von Aminosäure und Amin an den Ionenaustauscher ausgenutzt. Da Histamin im sauren Milieu ein stärkeres Kation darstellt als Histidin, wird es fester an Dowex 50 W X8 gebunden. Die Aminosäure kann also durch eine niedrigere Säurekonzentration aus ihrer Bindung am Ionenaustauscher verdrängt werden und läßt sich somit in einem diskontinuierlichen Salzsäuregradienten vor dem Erscheinen von Histamin eluieren und somit vom Amin trennen.

Die Kondensationsreaktion mit o-Phthaldialdehyd, die den fluoreszierenden Komplex ergibt, erfolgt für Histamin und Histidin wahrscheinlich nach einem gleichen oder sehr ähnlichen Mechanismus. Jedoch ergibt das Fluorophor, das mit Histidin gebildet wird, eine weit geringere Fluoreszenzintensität als das mit Histamin gebildete (UDENFRIEND, 1962). Das Produkt der Kondensationsreaktion wurde bisher noch nicht mit Sicherheit identifiziert. SHORE et al. (1959) vermuteten jedoch den in Abb. 5 dargestellten Reaktionsmechanismus, den sie aufgrund von bekannten Kondensationsreaktionen zwischen Histamin und Pyridoxalphosphat formulierten.

3.2.2. Durchführung der Bestimmung der Aktivität der DAO und Histidin- und Histaminkonzentrationen:

Alle enzymatischen Messungen wurden im Spektralphotometer (Beckmann DB-GT) oder Spektrallinienphotometer (Eppendorf) unter Luftatmosphäre in Quarzküvetten (QS; Hellma) bei Wellenlängen 340 nm und Glasküvetten (OS, Hellma) bei Wellenlängen 340 nm mit 1,000 cm Schichtdicke durchgeführt. Die Küvetten wurden in thermostabilisierten Küvettenhaltern auf einer Temperatur von

37° C gehalten. In zeitlichen Intervallen von 30" erfolgte ein automatischer Küvettenwechsel. Die Meßwerte wurden mit Laborschreibern registriert.

3.2.2.1. Bestimmung der DAO-Aktivität:

3.2.2.1.1. Bestimmung im NADH-Test:

Herstellung der Reagenzien:

Natrium-Kalium-Phosphat-Puffer (0,2 M, pH 7,6) - α -Oxoglutarat (171 mMol) (Boehringer, Mannheim) : 97,5 mg Na_2 - α -Oxoglutarat werden in 3ml Wasser gelöst oder 75 mg α -Oxoglutarsäure werden in 1 ml Wasser gelöst, 1-normale NaOH wird solange zugegeben, bis der pH 7,6 erreicht ist, mit Wasser wird das Volumen auf 3 ml aufgefüllt. - Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (p - NADH, 5,7 mM, Boehringer, Mannheim) : 12,1 mg NADH- Na_2 werden in 3 ml 1 %iger NaHCO_3 -Lösung aufgenommen. - Substratlösung (30 mMol Putrescin) : 14,5 mg Putrescin-dihydrochlorid, purum (Fluka) werden in 3 ml Phosphat-Puffer (0,2 M, pH 7,6) gelöst. - Glutamat-Dehydrogenase (GLDH, 10 mg/ml, Boehringer, Mannheim) : Die Stammlösung wird mit 50 %igem Glycerin soweit verdünnt, daß man eine Enzymaktivität von 3 U/0,05 ml erhält.

Durchführung der Bestimmung:

Die Inkubation wurde nach dem in der Tabelle 1 dargestellten Verfahren durchgeführt. Zur Kontrolle von unspezifischen, nicht durch die Diaminoxidasereaktion bedingten Extinktionsveränderungen wurden zwei Leerwerte mitgeführt.

- 1.) Leerwert ohne Substrat: Statt der Substratlösung wurde Puffer hinzugegeben.
- 2.) Reagenzien-Leerwert: Phosphat-Puffer wurde statt des Enzymextraktes hinzugegeben.

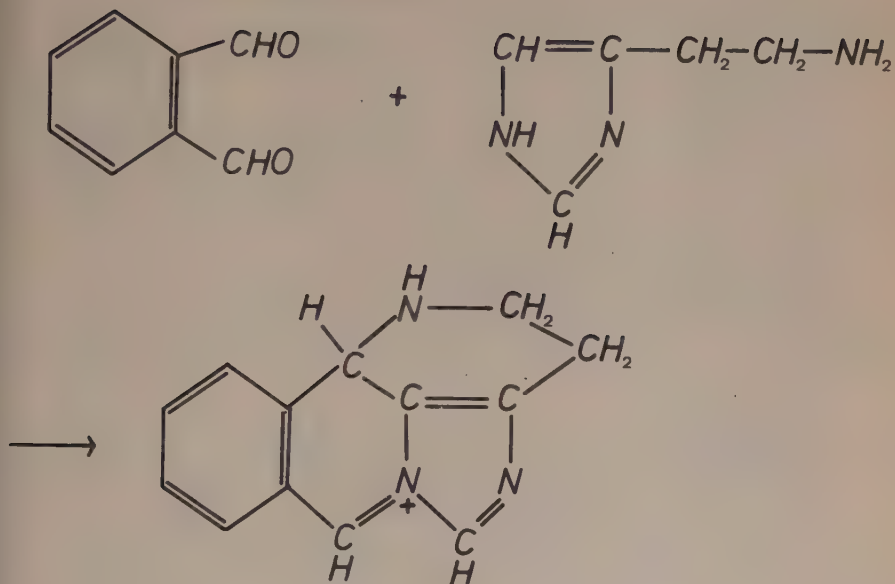


Abb. 5:

Reaktion zwischen o-Phthaldialdehyd und
Histamin (nach SHORE et al., 1959).

Nacheinander in die Küvette pipettieren		Endkonzentration im Test
Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,4)	1,55 - 1,65 ml	0,20 M
Indikatorsystem:		
GLDH	0,05	3,2 U/3 ml
α -Oxoglutaratlösung	0,1	5,7 mM
NADH-Lösung	0,1	0,19 mM
Enzympräparat	0,1 - 1,0	
Mit dem Plastikspatel gut mischen und 10 Min. stehen lassen, so daß das im Testvolumen vorhandene Ammoniak verbraucht wird. Start mit Substratlösung		
Substratlösung:	0,1	
Cadaverin		2,0 mM
Putrescin		1,0 mM
Histamin		0,1 mM
Mischen, alle 2 Min., etwa über 30 - 45 Min. ablesen		
Endvolumen	3,0	

Tab. 1:

Inkubationsansatz zur Bestimmung der Aktivität der Diaminoxydase im NADH-Test.

Die Reaktionsgeschwindigkeit wird bestimmt nach der Formel:

$$\frac{E \text{ Testwert} - F \text{ Leerwert}}{\text{Inkubationszeit } [\text{min}] \times \text{Menge Enzymextrakt } [\text{ml}]} = \frac{E}{[\text{min}] \times [\text{ml}]}$$

Die Berechnung der Diaminoxydase-Aktivität in

$\frac{\mu\text{u und Substratumsatz}}{[\text{min}] \times [\text{ml}]} = \text{mU/ml}$ war abhängig von der verwendeten Wellenlänge.

Wellenlänge: 334 nm

340 nm

336 nm

$$\text{mU/ml:} \quad 508,6 \times \frac{E}{[\text{min}] \times [\text{ml}]} \quad 485,9 \times \frac{E}{[\text{min}] \times [\text{ml}]} \quad 909 \times \frac{E}{[\text{min}] \times [\text{ml}]}$$

3.2.2.1.2. Durchführung der Bestimmung der Diaminoxydase-Aktivität im Isotopentest mit ^{14}C -Putrescin als Substrat:

Herstellung der Reagenzien:

Da die Präzision und Richtigkeit der Bestimmungen im Isotopentest abhängig waren von der strikten Einhaltung der Herstellungsvorschriften für die verschiedenen Lösungen, war es zweckmässig, diese genau in allen Einzelheiten zu beschreiben. Entsprechend den Vorschlägen von BERGMEIER (1970) ergibt sich das folgende Schema (KUSCHE et al., 1973a): Zur Herstellung der Lösungen wurde ausschließlich bidestilliertes Wasser benutzt. - Phosphat-Puffer (0,2 M, pH 7,6) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ und KH_2PO_4 p.a. (Merck) - Putrescin-Dihydrochlorid (15 mM) Purum (Fluka): 120,7 mg wurden in 50 ml Phosphat-Puffer gelöst - Putrescin - $1,4\text{-}^{14}\text{C}$ -Dihydrochlorid (The Radiochemical Center, Amersham): Spezifische Aktivität 17,8 mCi/mMol, 50 $\mu\text{Ci/Am}$ -pulle entsprachen einer Menge von 2,8 mMol Putrescin. Der

Inhalt einer Ampulle wurde in 50 ml der oben beschriebenen Lösung von unmarkiertem Putrescin gelöst. Es ergab sich eine spezifische Aktivität von $1 \mu\text{Ci/ml} = 2,2 \times 10^6$ dpm/ml. Da unter diesen Bedingungen das Verhältnis von markiertem zu unmarkiertem Putrescin 1 : 270 betrug, konnte der Anteil von markiertem Putrescin bei der Berechnung der Endkonzentration des Substrates im Ansatz vernachlässigt werden. - HClO_4 70 % p.a. (Merck) ($\sim 11,9 \text{ M}$): 7 ml wurden in Wasser ad 50 ml gelöst. Die angegebene Herstellungsvorschrift der Perchlorsäure mußte genau eingehalten werden, denn sie beeinflusste entscheidend den endgültigen pH der wässrigen Phase. - Stark alkalischer Puffer: 1000 ml gesättigte Natriumbikarbonatlösung (NaHCO_3 p.a., Merck) wurde bei Raumtemperatur hergestellt. Vom klaren Überstand wurden ca. 200 ml entnommen und mit 2 N Natronlauge auf pH 12,2 eingestellt (pH-Messung am pH-Meter mit Glaselektrode) - Toluol, 2,5-Diphenyloxazol (PPO, 0,35 %, p.a., Merck): Zu 1000 ml Toluol wurden 3,5 g PPO zugegeben. - ^{14}C -Toluol (Standardlösung, Buchler): $7,76 \times 10^5$ dpm/ml. Durchführung des Isotopentestes:

Die Inkubationen wurden unter Luftatmosphäre in verschließbaren Zentrifugengläsern durchgeführt, die unmittelbar zur Zentrifugation verwendet werden konnten. Die Inkubationstemperatur wurde in einem Thermoblock (Liebisch CH 12) auf 37°C konstant gehalten. Die einzelnen Schritte des Inkubations- und Extraktionsverfahrens werden in Tab. 2 dargestellt.

Zum Messen der Radioaktivität der Proben wurde ein Liquid Scintillations-Spektrometer benutzt (Modell Packard Tri-carb 3380). Von der erhaltenen Zählrate wurde automatisch eine Background-Aktivität von 30 cpm abgezogen. Zur Quench-Kontrolle wurde das externe Standard-Kanal-Verhältnis mittels eines externen Amauritium-Standards bestimmt. Weiterhin wurde zur Quench-Kontrolle eine bekannte Menge ^{14}C -Toluol als eine Art innerer Standard beigegeben.

	Menge (ml)	Zusammensetzung des Ansatzes
<u>Inkubationsverfahren:</u>		
Nacheinander in Zentrifugengläser pipettieren		
Phosphatpuffer	0,5	0,2 M
Enzym	0,2	
Mischen, auf 37° C erwärmen und die Reaktion starten mit Substrat:		
¹⁴ C-Putrescin und unmarkiertes Pu- trescin	0,05	0,001 M ~10 ⁵ dpm
Mischen und die Reaktionszeit abwarten. Nach definierten Inkubationszeiten (0, 15, 30, 45 min.) die Reaktion stop- pen mit Perchlorsäure		
	0,2	0,4 M
=====		
<u>Extraktionsverfahren:</u>		
Stark alkalischen Puffer (pH 12,2)	1,0	pH 10,0 ± 0,1
Toluol-PPO (0,35 %)	6,0	
Die Zentrifugengläser werden mit Glas- stopfen verschlossen und 4 min. ge- schüttelt; um eine Trennung von wässrig. und organischer Phase zu erzielen, wurde kurz zentrifugiert, bei -20 bis -40° C wird die wässrige Phase im Äthanolbad eingefroren		
<u>Flüssigkeitsscintillationsspektrometer:</u>		
In spezielle, zur Scintillationszählung geeignete Polyäthylenfläschchen werden folgende Lösungen gegeben:		
Toluol-PPO (0,35 %)	5,0	
Die organische Phase wird von der tief- gefrorenen wässrigen Phase dekantiert.	6,0	
Die Polyäthylenfläschchen werden ver- schlossen und in den Scintillations- zähler gestellt.		

Tab. 2:

Inkubations-, Extraktions- und Meßverfahren zur Bestimmung
der Diaminoxidase-Aktivität im Isotopen-Test.

Substrate: ¹⁴C-Putrescin und unmarkiertes Putrescin.

Der wesentlich aussagefähigere innere Standard, zugesetztes ^{14}C - Δ_1 -Pyrrolin, konnte nicht verwendet werden, da diese Substanz im Handel nicht erhältlich war. Mit ^{14}C -Toluol-Standard wurden zwei Kontrollversuche durchgeführt.

1. 0,05 ml ^{14}C -Toluol (38000 dpm) wurden dem Ansatz vor Durchführung der Extraktion beigegeben.
2. 0,05 ml ^{14}C -Toluol wurden den Proben unmittelbar vor der Zählung beigegeben.

Um sicher zu stellen, daß die radioaktiven Produkte, die in die organische Phase extrahiert wurden, auch während der Diaminoxidasereaktion entstanden waren, wurden jeweils zwei Leerwerte mitgeführt.

1. Leerwert ohne Diaminoxidaseaktivität. Das Enzym wurde mit Perchlorsäure inaktiviert, bevor die Substratlösung beigegeben wurde (Inkubationszeit 0 min.).
2. Reagenzienleerwert:
Phosphatpuffer wurde statt des Enzyms hinzugegeben. Es sollten keine Unterschiede in den Zählraten für beide Leerwerte auftreten.

Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde nach der folgenden Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Testwert } [\text{cpm}] - \text{Leerwert } [\text{cpm}]}{\text{Inkubationszeit } [\text{min}] \times \text{Menge d. Organextr. } [\text{ml}]} = \frac{[\text{cpm}]}{[\text{min}] \times [\text{ml}]}$$

Die Diaminoxidaseaktivität wurde zunächst stets in cpm/min angegeben. Die Umrechnung in Internationale Einheiten (mU) erfolgte durch die Eichung des Isotopentestes mit dem NADH-Test.

3.2.2.1.3. Durchführung der Bestimmung der Diaminoxydase-
Aktivität im o-ABA-Test (HOLMSTEDT und THAM, 1959;
WERLE und SCHIRREN, 1965):

Herstellung der Reagenzien:

Natrium-Kalium-Phosphat-Puffer (0,2 M, pH 7,6) - o-Aminobenzaldehyd, Purum (Fluka): 500 mg werden in 500 ml Puffer eingewogen, auf 50° C erwärmt und 15 min. geschüttelt. Der noch ungelöste Teil des o-Aminobenzaldehyd wird anschließend abfiltriert. Das klare, gelbe Filtrat wird mit Phosphatpuffer soweit verdünnt, daß sich bei 400 nm im Spectralphotometer (DB GT, Beckmann) eine Extinktion E = 1,3 ergibt. - Substratlösung: 50 mM Putrescin, Purum (Fluka): 24,15 mg Putrescin werden in 3 ml Phosphatpuffer gelöst; 50 mM Cadaverin-Dihydrochlorid, Purum (Fluka): 26,25 mg in 3 ml lösen; - 10 % Trichloressigsäure p.a. (Merck).

Durchführung der Bestimmung:

Die einzelnen Schritte sind in Tab. 3 dargestellt. Nach dem Stop der Diaminoxidasereaktion nach definierten Zeitintervallen (z. B. 0, 20, 40, 50 min.) durch Säurefällung wurde das präzipitierte Protein bei 1800 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Extinktion bei 430 nm gemessen. Im Leerwert wurde das Substrat nach der Säureinaktivierung des Enzyms (Inkubation bei 0 min.) zugesetzt. Entsprechend den durchgeführten Vergleichsmessungen und Berechnungen (WERLE und SCHIRREN, 1965; LORENZ u. Mitarb., 1967) kann die Diaminoxydaseaktivität wie folgt berechnet werden:

$$\frac{E_{\text{Testwert}} - E_{\text{Leerwert}}}{\text{Inkubationszeit [min]} \times \text{[ml]} \text{ Enzympräparat}} \times 87,2 = \text{mU/ml}$$

Nacheinander in Zentrifugengläser pipettieren:		Endkonzentration im Ansatz
Phosphatpuffer pH 7,6	1,5 ml	0,2 M
o-Aminobenzaldehydlösung	2,5 ml	ca. 0,0025 M
Enzym	0,5 ml	ca. 0,8 - 3,5
Substrat: Putrescin oder Cadaverin		0,001 M
	0,5 ml	0,010 M
Nach definierten Zeitabschnitten (0, 20, 40, 60 min.) Reaktion stoppen mit		
Trichloressigsäure (10 %)	1,0 ml	1,6 %

Tab. 3:

Inkubationsansatz zur Bestimmung der Diaminoxydaseaktivität
mit dem o-Aminobenzaldehyd-Test.

3.2.2.2. Fluorometrische Bestimmung von Histidin- und Histaminkonzentration nach Ionenaustauscher-Chromatographie an Dowex 50W - X8:

Vorbereitung der Reagenzien:

Vorbereitung des Ionenaustauschers (LORENZ et al., 1972). Frisch gelieferter, ungebrauchter Ionenaustauscher und bereits gebrauchter, bei 0 - 4° C gelagerter Ionenaustauscher wurden gleich behandelt. Dowex 50W X8 (H⁺, mesh 200 - 400, Serva) wurde zunächst 5 mal mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend in 2-normaler Natronlauge 20 min. aufgerührt (1 g feuchter Ionenaustauscher + 6 ml Flüssigkeit (Whatman, Laboratory Manual)). Die Lauge wurde dekantiert und der Ionenaustauscher solange mit bidestilliertem Wasser gewaschen, bis ein pH von 5 - 6 erreicht war. Durch die Zugabe von 2 N HCl zum feuchten Dowex (1 : 7 w/v) wurde das Harz in die H⁺-Form übergeführt und anschließend wiederum bis zum Erreichen eines pH von 5 - 6 mit Aqua bidest. gewaschen. Der so vorbereitete Dowex 50W - X8 konnte im Kühlschrank (0 - 4° C) für ca. 4 Wochen aufbewahrt werden. Unmittelbar vor Gebrauch wurde der Ionenaustauscher zweimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen und dann mit 0,1 M Natrium-Phosphat-puffer, pH 6,5, äquilibriert. Zur Herstellung des Ionenaustauscherbettes wurde eine Suspension des Harzes in Puffer (1 : 3 w/v) hergestellt, die durch intensives Mischen auf einem Magnetrührer homogen gehalten wurde. Von dieser Suspension wurde jeweils 1 ml mittels einer Eppendorf-Pipette (Nessler & Hinz, Hamburg), von deren Pipettenspitze 3 mm zum Erhalt einer genügend weiten Öffnung abgeschnitten worden waren, in die speziellen Chromatographieröhrchen (Abb. 6) gegeben.

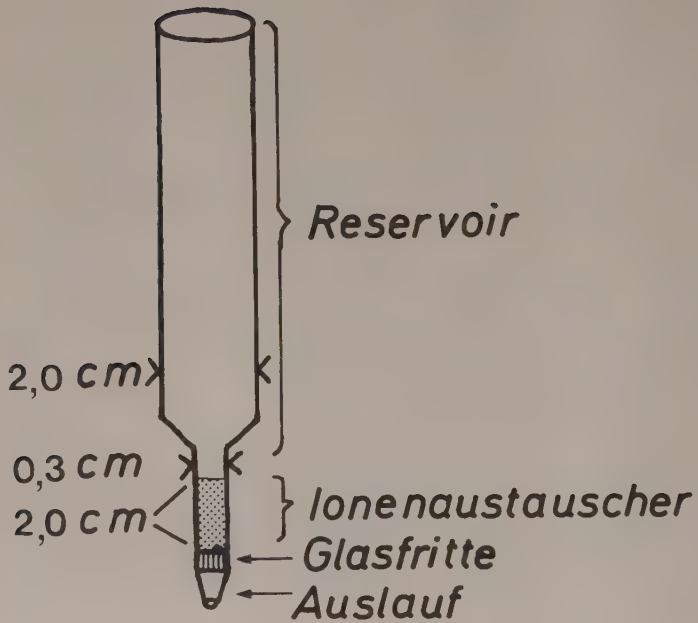


Abb. 6:

Glasröhrchen zur Durchführung der Isolierung von Histamin durch Ionenaustauscherchromatographie an Dowex 50W X8 (nach LORENZ et al., 1972).

Reagentien zur Histaminbestimmung:

Vorbereitete Organproben (Kap. 3.1.2.) und Dowex-Röhrchen (Abb. 6). - Zur Ionenaustauscher-Chromatographie: Salzsäure 32 % p.a. (Merck) (1 N HCl, 4 N HCl) Aqua bidest. - zur fluorometrischen Histaminbestimmung: Histamindihydrochlorid purissimum (Fluka), 1 % o-Phthalaldehyd purum und Phthaldialdehyd purum (Fluka) (unkristallisiert in Petroläther p.a., Sp 40 - 60) (Merck) und Methanol für Spektroskopie (Merck); Natriumhydroxid p.a. (Merck) (5 N NaOH); Ortho-Phosphorsäure 85 % p.a. (Merck) (1 M H_3PO_4).

Reagentien zur kombinierten Bestimmung von Histidin und Histamin:

Vorbereitete Organproben (Kap. 3.1.2.) und Dowex-Röhrchen (Abb. 6). - Zur Ionenaustauscher-Chromatographie: 0,05 M Na^+ - Phosphatpuffer pH 5,5, Salzsäure 32 % p.a. (Merck) (0,1 N HCl, 1,4 N HCl, 4 N HCl) - zur fluorometrischen Bestimmung von Histidin und Histamin: Histamindihydrochlorid Purissimum (Fluka); L-Histidin, Puriss. (Fluka); 1 % o-Phthalaldehyd (s.o.); 3 N NaOH; 5 N NaOH; 1 M H_3PO_4 ; 5 M H_3PO_4 .

Durchführung der fluorometrischen Histidin- und Histaminbestimmung:

Trichloressigsäureextrakte aus Organen (Kap. 3.1.2.) wurden an der Glaselektrode mit 1 N NaOH auf pH 5,5 eingestellt. Die Probe, die nach der pH-Korrektur ein Volumen von 4,0 ml nicht wesentlich überschreiten sollte, wurde auf die äquilibrierten Säulen aufgetragen. Die weiteren Schritte erfolgten entsprechend Tab. 4. Die Histidin- bzw. Histamin-haltigen Eluate wurden zur fluorometrischen Messung, wie in Tab. 5 beschrieben, vorbereitet. Das Fluorophor war für ca. eine Stunde stabil. Die erzielte Fluoreszenz war einer Menge von 25 bis 100000 ng Histidin und 1 - 700 ng/ml Histamin pro 100 ml verdünntem Eluat proportional.

Die Messung selbst erfolgte im Zeissfluorometer unter der Verwendung von Fluorometer-Quarz-Küvetten (1.000 cm Schichtdicke, QS; Hellma) bei folgenden Wellenlängen:

	Excitation	Emission
Histidin	350 nm	450 nm
Histamin	360 nm	450 nm

Die Spaltbreite betrug am Excitationsmonochromator 1,0 cm und am Emissionsmonochromator 0,5 cm.

Die Berechnung der im Ansatz vorliegenden Histidin- und Histaminmengen erfolgte anhand von Eichkurven, die mit im Handel erhältlichen Histidin bzw. Histamin hergestellt wurden.

Kontroll- und Leerwerte:

Zur Kontrolle der Ausbeute an gesuchter Aminosäure oder an Amin wurden bei jeder Untersuchungsserie mindestens zwei Organextrakten eine bekannte Menge Standardsubstanz zugesetzt, die in etwa der in der Probe zu erwartenden Menge entsprach. Wurden verschiedene Organe innerhalb einer Meßserie analysiert, so wurde für jedes Organ ein Ausbeutewert mitgeführt. Die Ausbeute lag bei 70 - 80 % für Histidin und für Histamin bei 90 - 100 %. Der Verlust an Standardsubstanz wurde bei der Berechnung der Histidin- und Histamingehalte der Proben berücksichtigt.

Es wurden zwei verschiedene Leerwerte verwendet:

1. Der 'Umkehr-Blank' (SHORE u. Mitarb., 1959).

Dabei erfolgte beim fluorometrischen Meßansatz der Zusatz von Phosphorsäure vor der Zugabe von o-Phthalaldehyd, so daß die für Histidin und Histamin spezifische Kondensation mit Histidin bzw. Histamin unter Bildung der Fluorophore nicht mehr stattfinden konnte. Erhöhte Werte in 'Umkehr-Blanks' wiesen auf unspezifische Fluoreszenz im Ansatz hin.

Nacheinander auf die äquilibrierten Dowex-Säulen auftragen	Menge (ml)	Konzentration
---	---------------	---------------

Trichloressigsäure (3,8 %)

Organextrakt

4

Waschschritte:

I Natriumphosphatpuffer pH 5,5

4

0,05 M

II HCl

4

0,1 N

Elution von Histidin:

III HCl

4,5

1,4 N

Das Eluat wird in Reagenzgläsern aufgefangen.
Auswaschen von noch auf der Säule verbliebenem Histidin, dieser Teil des Eluats wird verworfen

IV HCl

3,5

1,4 N

Elution von Histamin:

V HCl

3

4 N

Das Eluat wird in Reagenzgläsern aufgefangen, in denen 3 ml Aqua bidest. vorgelegt wurden.
Die Eluate III und V werden für die fluorometrische Histidin- und Histaminbestimmung verwendet.

Tab. 4:

Verfahren zur gleichzeitigen Isolierung von Histidin und Histamin aus einer Probe durch Ionenaustauscher-Chromatographie an Dowex 50W-X8.

Nacheinander in Reagenzgläser pipettieren:	Menge (ml)	Konzentration d. Lösungen
---	---------------	------------------------------

Histidinbestimmung:

I Eluat von Dowex 50W-X8 oder Standardhistidinlösung in 1,4 N HCl	1,5	
II NaOH	1,0	3 N
III o-Phthaldialdehyd	0,1	0,1 %

30 min. bei Zimmertemperatur stehen
lassen; o-Phthaldialdehyd kondensiert
mit Histidin

H_3PO_4	0,5	
-----------	-----	--

Histaminbestimmung: (modifiziert nach
LORENZ u. Mitarb., 1970a)

IV Eluat oder Standardhistaminlösung in 2 N HCl	1,0	
V NaOH	0,5	5 N
VI o-Phthaldialdehyd	0,1	0,1 %

2 min. bei Zimmertemperatur stehen
lassen; Histamin kondensiert mit
o-Phthaldialdehyd

VII H_3PO_4	1,0	1 N
---------------	-----	-----

Tab. 5:

Durchführung der fluorometrischen Bestimmung von
Histidin und Histamin.

2. Dem Reagentienleerwert wurde an Stelle von Organextrakt Puffer zugesetzt. Dieser Wert durchlief die gesamte oben beschriebene Isolierungs- und Meßprozedur.

3.2.3. Proteinbestimmung:

Zur Proteinbestimmung benutzten wir die Biuretreaktion nach WEICHSELBAUM (1946). In gereinigten Enzympräparaten mit einem Proteingehalt (1 mg/ml) wurde der Eiweißgehalt nach LOWRY et al. (1951) bestimmt.

3.2.4. Stabilität der Lösungen:

Die Lösungen von radioaktivem Substrat, die in Portionen von je 5 ml aufgeteilt und bei -20°C gelagert worden waren, erwiesen sich für mindestens zwei Monate stabil.

α -Oxoglutarat und NADH (gelöst in 1 % NaHCO_3) wurde bei $0 - 4^{\circ}\text{C}$ gelagert und wöchentlich neu angesetzt. GLDH, gelöst in Glycerin, zeigte keinen signifikanten Aktivitätsverlust innerhalb von 6 Monaten bei einer Lagerung bei $0 - 4^{\circ}\text{C}$.

3.2.5. Statistische Berechnungen:

Die Berechnungen des Mittelwertes ($\bar{x}$) und der Standardabweichung (S.D.) wurden ebenso wie statistische Signifikanzberechnungen auf dem Kleincomputer Olivetti Programma 102 vorgenommen.

Die Signifikanzberechnungen erfolgten entweder nach dem Student-t-Test oder nach dem Student-t-Test für gepaarte Daten.

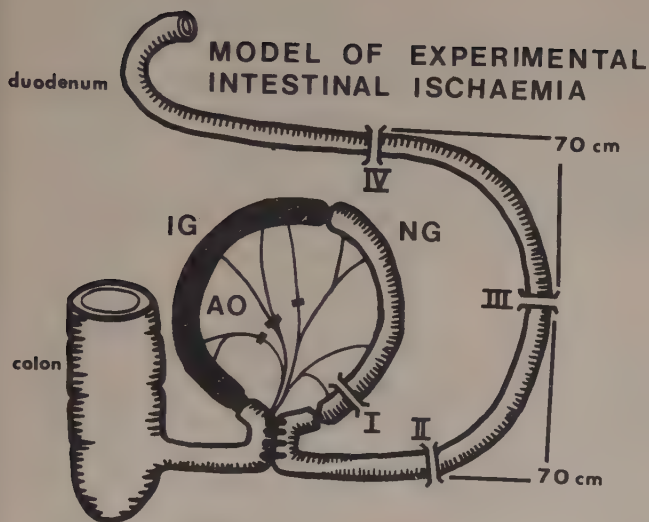
3.2.6. Versuchsmodell zur experimentellen Ischämie am Dünndarm des Hundes:

Als Versuchstiere verwendeten wir Bastardhunde (s. Kap. 3.1.1.). In Pentobarbital-Narkose (25 mg/kg) wurden die Tiere bei Spontanatmung belassen. Die Körpertemperatur wurde mittels eines rektal eingeführten Thermometers kontrolliert. In der Arteria femoralis wurde ein Polyäthalkatheter bis zur Aorta abdominalis vorgeschoben, um den arteriellen Druck mit Hilfe eines Druckwandlers (Statham), einer Meßbrücke (Hellige) und eines Labor-schreibers (RikaDenki) fortlaufend registrieren zu können. Das verwendete Versuchsmodell der Ischämie am terminalen Ileum des Hundes gestattete die Untersuchung von Veränderungen der DAO-Aktivität, der Histidin- und Histaminkonzentrationen im ischämischen Darmbereich, ebenso wie die Verfolgung von etwaigen Reaktionen im benachbarten nicht ischämischen Darm.

Nach Desinfektion der Bauchdecken (Merfen^(R)) und medianer Laparotomie wurde durch Seit-zu-Seit-Anastomose (Abb. 7) eine Schlinge des terminalen Ileum von 30 - 40 cm Länge aus der Darmpassage ausgeschaltet. Das Lumen der Schlinge wurde durch eine Spülung mit 1000 ml Ringerlösung (37° C) gereinigt. Ligaturen unterteilten die Schlinge in zwei Abschnitte, deren Lumina einen jeweils für sich abgeschlossenen Raum bildeten.

In der nächsten Phase der Operation wurden an den, in Abb. 7 mit I - IV bezeichneten Stellen, Gewebeproben (ca. 1 g) entnommen und der Darm anschließend wieder durch einschichtige Naht verschlossen.

Schließlich wurde als dritte Phase der Operation die Ischämie im distalen Abschnitt der Schlinge durch Unterbindung der Arterien der entsprechenden Gefäß-Arkaden erzeugt.



IG : ISCHAEMIC GUT
 NG : NON ISCHAEMIC GUT
 AO : ARTERIAL OCCLUSION
 I-IV : EXCISIONS

Abb. 7:

Schema zur Durchführung der experimentellen
 Ischämie am terminalen Ileum des Hundes.

Nach der Operation wurde das Abdomen sorgfältig verschlossen und die Wunde mit sterilen Tüchern abgedeckt. Die Operationsdauer betrug 30 - 45 min. 10 Stunden nach Ischämiebeginn wurde der Bauchraum wieder eröffnet, die gesamte ausgeschaltete Schlinge mit ihrem ischämischen und nichtischämischen Anteil entnommen sowie Gewebeproben ca. 5 cm proximal der mit II - IV bezeichneten Punkte. Die entnommenen Gewebeproben wurden sofort tiefgefroren und möglichst bald zur Messung der Diaminoxydase-Aktivität und zur Bestimmung des Histidin- und Proteingehaltes weiterverarbeitet (s. Methodik).

Scheinoperierte Tiere:

Um unspezifische, nur durch das Operationsverfahren bedingte Veränderungen der untersuchten Parameter ausschließen zu können, wurde eine Gruppe von 5 scheinoperierten Tieren mit einbezogen. Bei den Scheinoperationen wurden alle Details des beschriebenen Tierexperiments (z. B. auch die Darstellung der Arterien) mit Ausnahme der Auslösung der Ischämie durchgeführt.

Die Auswahl der Tiere innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe erfolgte in randomisierter Reihenfolge (SNEDECOR und COCHRAN, 1967).

4. Ergebnisse:

4.1. Die Diaminoxydase-Aktivität in verschiedenen Organen des Hundes:

Die Erfahrungen während der Untersuchungen über die Funktion der DAO im Dünndarm des Hundes zeigten, daß es wegen mancher widersprüchlicher Angaben in der Literatur nötig war, die DAO-Aktivität in den verschiedenen Organen des Hundes erneut zu untersuchen, und zwar unter der Berücksichtigung der Forderungen, die in der klinischen Chemie an die Optimierung und Standardisierung eines Enzymtestes gestellt werden (RICHTERICH, 1968).

Im o-ABA- und Isotopentest erwies sich außer dem Darm (s. Tab. 7) - wie bereits bekannt - die Niere beim Hund als das Organ mit der höchsten DAO-Aktivität (Tab. 6). In Leber, Pankreas, Milz und Lunge konnten mit dem Isotopentest nur Spuren des Enzyms nachgewiesen werden. Überraschend hoch war der Gehalt der mesenterialen Lymphknoten an DAO-Aktivität, ein Befund, der mit der relativ hohen Konzentration von DAO in der Ductus thoracicus-Lymphe in Zusammenhang gesehen werden muß (CARLSTEN, 1950).

4.2. Diaminoxydase-Aktivität, Histidin- und Histamin-konzentration in verschiedenen Abschnitten des Hundedarmes:

Der Dünndarm erwies sich nach der Niere als das Organ des Hundes mit der zweithöchsten DAO-Aktivität (Tab. 7). Das Enzym ist jedoch nicht gleichmäßig über den Darm verteilt, sondern zeigt einen zu den distalen Abschnitten hin zunehmenden Gradienten. Die Aktivität nimmt vom oberen Jejunum mit $9,1 \pm 3,4$ mU/g zum unteren Ileum mit $19,0 \pm 13,0$ mU/g zu. Umgekehrt verhält sich die Histaminkonzentration entlang der Darmwand, da sie von den proximalen zu den distalen Abschnitten hin abnimmt. Im oberen Jejunum fanden wir $29,3 \pm 23,2$ µg/g

und im unteren Ileum $7,0 \pm 10,0 \mu\text{g/g}$. Zwischen beiden Parametern entsteht eine reziproke Korrelation. Mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = -0,76$ ist diese Beziehung statistisch signifikant ($p < 0,05$) (RICHTER et al., 1972). Dieser Befund könnte darauf hindeuten, daß Diaminoxydase-Aktivität und Histaminkonzentration im Dünndarm sich gegenseitig beeinflussen.

Ein einheitliches Verhalten zeigt die Histidinkonzentration entlang der Darmwand. Im oberen Jejunum konnten wir $70,4 \pm 43,7 \mu\text{g/g}$ bei $n = 5$ und im unteren Ileum $69,8 \pm 37,0 \mu\text{g/g}$ nachweisen. Nur das obere Ileum zeigte mit $59,6 \pm 30,5 \mu\text{g/g}$ einen etwas geringeren Histidingehalt.

4.3. Reinigung der DAO aus dem Hundedarm:

Zur Untersuchung der Eigenschaften der DAO aus Hundedarm, insbesondere zur Prüfung ihrer Substratspezifität, war es nötig, das Enzym zu reinigen. Die DAO des Hundedünndarmes konnte in Anlehnung an die von KAPPELLER-ADLER (1963) und MONDOVI (1964) für die Schweineniere beschriebenen Verfahren 734-fach bis zu einer spezifischen Aktivität von $36,7 \text{ mU/mg Protein}$ angereichert werden. Im einzelnen wurden folgende Reinigungsschritte durchgeführt.

1. Rohextrakt:

Von Bastardhunden wurde in Pentobarbitalnarkose (25 mg/kg) der gesamte Dünndarm entnommen und mit kalter physiologischer Kochsalzlösung sauber gespült. Anschließend wurde er bei -20°C tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurde der Dünndarm mit drei Volumenanteilen $0,1 \text{ M Natrium-Kalium-Phosphat-Puffer pH } 7,6$ homogenisiert und anschließend 30 Minuten bei 18000 g zentrifugiert. Der Überstand bildete den Rohextrakt.

Gewebe	n	Diaminoxydase-Aktivität (mU/g Frischgewicht) $\bar{x} \pm \text{S.D.}$
--------	---	--

Gl. submandi- bularis	5	0
Gl. parotis	5	0
Leber	5	0,10 $\pm$ 0,09
Pankreas	5	0,10 $\pm$ 0,08
Milz	5	0,08 $\pm$ 0,07
Mesenterial- lymphknoten	5	3,8 $\pm$ 2,7
Niere	5	39,2 $\pm$ 16,5
Lunge	5	0,06 $\pm$ 0,06
Thymus	5	0
Schilddrüse	5	0

Tab. 6:

Diaminoxydase-Aktivität in verschiedenen Organen des Hundes. Bestimmung im Isotopentest (^{14}C -Putrescin und kaltes Putrescin 10^{-3}M).
Sonstige Bedingungen s. Material und Methodik.

Darmabschnitt	n	DAO [mU/g]	n	Histamin [μg/g]	n	Histidin [μg/g]
oberes Jejunum	7	9,1 ± 3,4	8	29,3 ± 23,2	5	70,4 ± 43,7
unteres Jejunum	7	12,3 ± 6,1	7	26,2 ± 27,7	5	71,5 ± 59,9
oberes Ileum	7	18,5 ± 11,0	8	19,3 ± 17,5	5	59,6 ± 30,5
unteres Ileum	10	19,0 ± 13,0	10	7,0 ± 10	7	69,8 ± 37,0
Colon	7	14,7 ± 4,2		-		-

Tab. 7:

Diaminoxidase-Aktivität, Histamin - und Histidinkonzentration in verschiedenen Abschnitten des Darmtraktes beim Hund.

$\bar{x} \pm S.D.$ Bestimmung der DAO-Aktivität im o-ABA und Isotopen-test (Substrat: Putrescin $10^{-3}M$). Nach Entnahme des ganzen Darmes entsprach die Entnahmestelle für oberes Jejunum einem Abstand von 30 cm distal des Magens, unteres Jejunum dem Ende des 1. Darmdrittels, oberes Ileum 30 cm distal davon, unteres Ileum 20 cm vom Ende des Dünndarmes. Es wurde die ganze Darmwand verwendet. Sonstige Bedingungen s. Material und Methodik.

2. Hitzeschritt:

Als nächster Reinigungsschritt wurde mit dem Rohextrakt eine Proteinpräzipitation durch Hitze vorgenommen. Dazu wurde unter ständigem Rühren der Rohextrakt in Portionen von ca. 200 ml in Metallbechern möglichst rasch im Wasserbad auf 60° C erhitzt und 10 min. bei dieser Temperatur belassen. Danach wurde der Metallbecher in ein Eisbad getaucht, so daß eine möglichst rasche Abkühlung gewährleistet war. Das präzipitierte Protein wurde 20 Minuten bei 48000 g abzentrifugiert.

3. Ammoniumsulfatfällung:

Mit dem Überstand wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Die Durchführung der Ammoniumsulfatfraktionierung wurde dadurch erschwert, daß das Enzymprotein über einen sehr weiten Konzentrationsbereich des Salzes präzipitierte. Bei 25 % Ammoniumsulfatsättigung war bereits deutlich Diaminoxidase-Aktivität im Niederschlag nachweisbar, 20 % Sättigung erbrachten dagegen kaum noch eine Fällung von inertem Protein. Aus diesem Grunde wurde auf eine fraktionierte Fällung von Protein durch Ammoniumsulfat verzichtet und lediglich eine Präzipitation bei 60 % Ammoniumsulfatsättigung durchgeführt. Das Präzipitat nach 60 % Ammoniumsulfatsättigung wurde nach Zentrifugieren (30 min., 18000 g) gesammelt und zur Entsalzung 12 Stunden gegen 20 Liter 0,01 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6 dialysiert.

4. Ionenaustauscher-Chromatographie an DEAE-Cellulose:

Nach der Dialyse konnte mit dem Enzympräparat eine Ionenaustauscher-Chromatographie an DEAE-Cellulose durchgeführt werden. Der Anionenaustauscher (Säulenabmessung: 4 x 55 cm) wurde mit 0,01 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6 äquilibriert. Nach Auftrag des Proteins und Waschen mit dem gleichen Puffer wurde die Diaminoxidase mit einem 2,5 %igen linearen NaCl-Gradienten eluiert (Volumen im Mischgefäß

Aus- beute (%)	Verfahren	Volumen (ml)	Total- aktivi- tät (mU)	Total- protein- gehalt (mg)	Spez. Aktivi- tät (mU/mg)	Anrei- chung
100	Homogeni- sation	5,817	48,50	959,80	0,05	1
88	Hitze- schritt 10 min. 60° C	4,345	17,50	74,30	0,23	1,4
7,5	Ammonium- sulfat 20-60 %	200	3,650	7,80	0,47	9,4
7,6	DEAE- Cellu- lose	372	3,720	560	6,6	132
4,6	Sepha- dex G200	203	2,232	61	36,7	734

Tab. 8:

Reinigung der DAO (EC 1.4.3.6) aus dem Hundedünndarm.

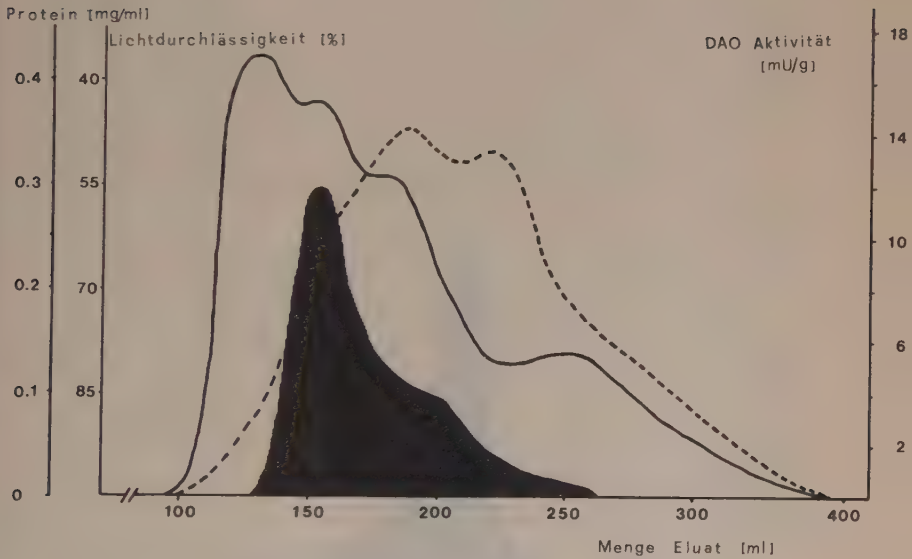


Abb. 8:

Ionenaustauscherchromatographie eines Präparates
aus Hundedünndarm an DEAE-Cellulose.

DAO-Aktivität; ————— Lichtdurchlässigkeit;
----- Proteingehalt.

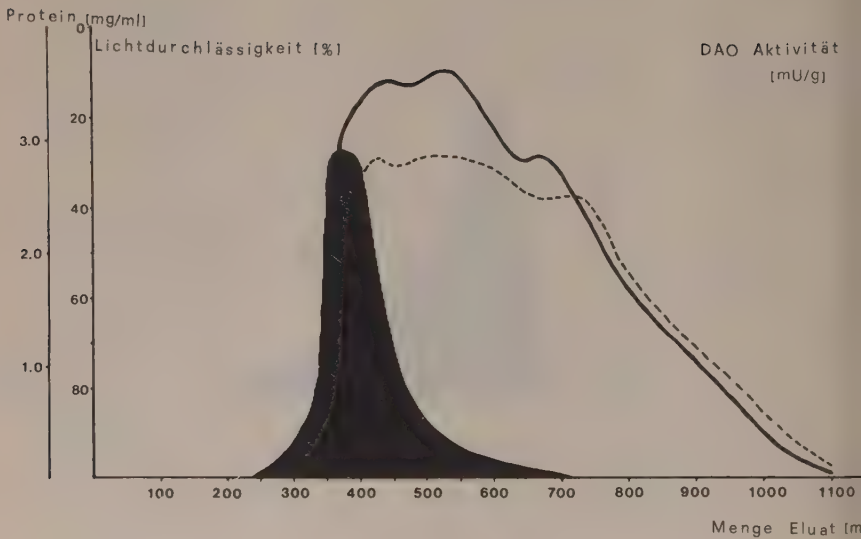


Abb. 9:

Gelfiltration eines Präparates aus Hundedünndarm
an Sephadex G 200.

||||| DAO-Aktivität; ————— Lichtdurchlässigkeit
----- Proteingehalt.

500 ml, 0,5 ml/min. Elutionsgeschwindigkeit). Das Elutionschromatogramm wurde mit einem UV-Monitor Uvikord II (LKB) bei 280 nm aufgezeichnet. Das Enzym erschien im ersten Protein-Peak.

Die diaminoxydasehaltigen Fraktionen wurden gesammelt und in Portionen von 5,0 ml an Sephadex G 200 (Säulenabmessung: 5 x 50 cm), äquibriert mit 0,1 M Natrium-Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,6, gelfiltriert.

Die Enzympräparate der verschiedenen Reinigungsstufen zeigen, wenn sie bei -40°C gelagert wurden, über 8 Wochen keine Abnahme der Aktivität, mit Ausnahme des Präparates nach Sephadex G 200, das innerhalb von 3 Tagen seine Aktivität gegenüber Cadaverin als Substrat vollständig verlor.

4.4. Eigenschaften der DAO aus dem Hundedarm:

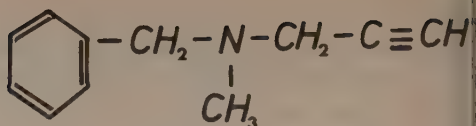
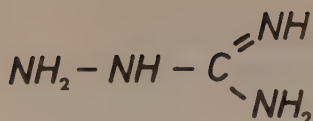
4.4.1. pH-Optimum:

Zur Untersuchung der Eigenschaften des Enzyms aus Hundedarm wurde das nach Ionenaustauscherchromatographie 130-fach angereicherte Präparat der Diaminoxydase verwendet. Mit Hilfe der Isotopenmethode bestimmten wir das pH-Optimum der Diaminoxydase aus dem Darm. Zwischen den pH 7,2 - 7,8 erreichte das Enzym seine größte Reaktionsgeschwindigkeit. Die Untersuchung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration mit dem NADH-Test führte zu dem gleichen Ergebnis.

In beiden Fällen wurde Putrescin (1 mM) als Substrat verwendet.

4.4.2. Hemmung der Diaminoxydase aus Hundedarm:

Charakteristisch war das Verhalten der Diaminoxydase des Hundedarmes gegenüber Aminoguanidin und Pargylin.



Aminoguanidin

Pargylin

Aminoguanidin stellt nach bisheriger Kenntnis den spezifischen Hemmstoff der Diaminoxydase dar, Pargylin gehört zu den typischen Hemmstoffen der Monoaminoxydase.

Die Diaminoxydase des Hundedarmes wird durch Aminoguanidin in einer Konzentration von $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ noch zu 50 % gehemmt, 100 % Hemmung wurde bei einer Konzentration von 10^{-4} M beobachtet. Bei Pargylin betrug die ID 50 für die Diaminoxydase $2,5 \times 10^{-3} \text{ M}$, wenn wie bei Aminoguanidin Putrescin (10^{-3}) als Substrat eingesetzt wurde. Pargylin ist also ein $5,5 \times 10^4$ mal schwächerer Hemmstoff als Aminoguanidin. Eine 100 %ige Hemmung konnte durch Pargylin nicht erreicht werden, da die benötigte Menge nicht mehr in Lösung gebracht werden konnte. Die starke Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms aus dem Hundedarm weist darauf hin, daß das Enzym tatsächlich den Diaminoxidasen zuzurechnen ist. Daß die Aktivität einer Diaminoxydase durch Pargylin, wenn auch nur in geringem Maße, beeinflußt wird, war bisher nicht bekannt.

4.4.3. Substratspezifität der Diaminoxydase aus Hundedarm:

Zur Untersuchung der Substratspezifität der Diaminoxydase aus dem Hundedarm wurde zunächst das Verhalten des Enzyms gegenüber Putrescin, einem der bevorzugten Substrate der Diaminoxydase, untersucht. Das Enzym erreicht seine maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Putrescinkonzentration von 10^{-3} M (Abb. 12).

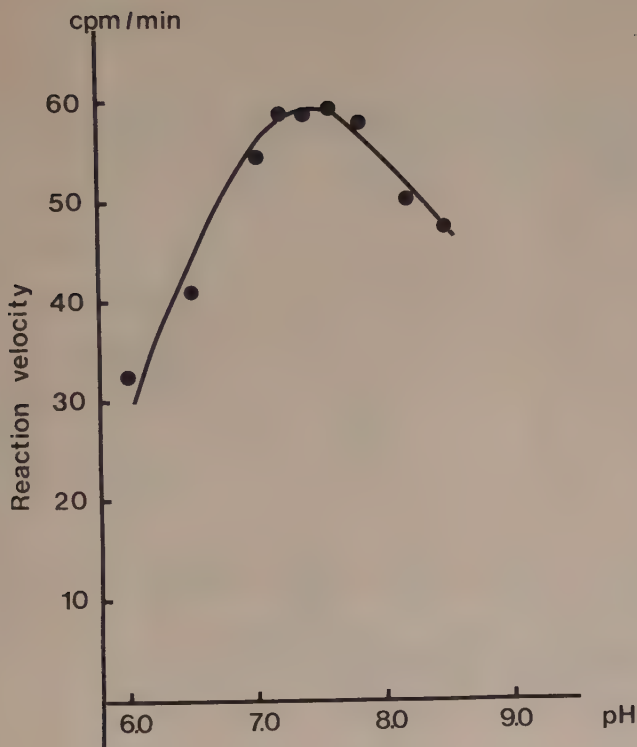


Abb. 10:

pH-Abhängigkeit der Aktivität der Diaminoxydase aus Hundedarm mit Putrescin als Substrat.

Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Putrescinkonzentration 10^{-3} M. Bestimmung der Diaminoxydase-Aktivität im Isotopentest. Enzympräparat nach Chromatographie an DEAE-Cellulose.

Inhibition of Intestinal DAO by Aminoguanidine and Pargyline

Substrate : putrescine [10^{-3} M]

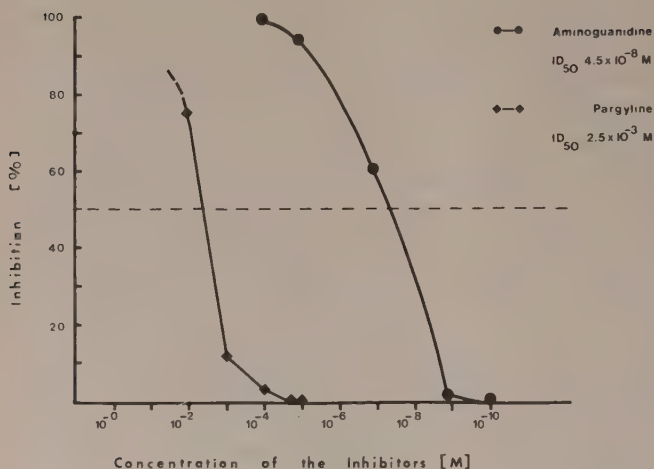


Abb. 11:

Hemmung der Darmdiaminoxidase des Hundedarmes durch Aminoguanidin und Pargylin. Mittelwerte aus zwei Versuchen. pH 7,6, Putrescinkonzentration 1×10^{-3} M. Zugabe des Hemmstoffes zum Ansatz in 0,1 ml Phosphatpuffer. Bestimmung der Enzymaktivität im NADH- und Isotopentest.

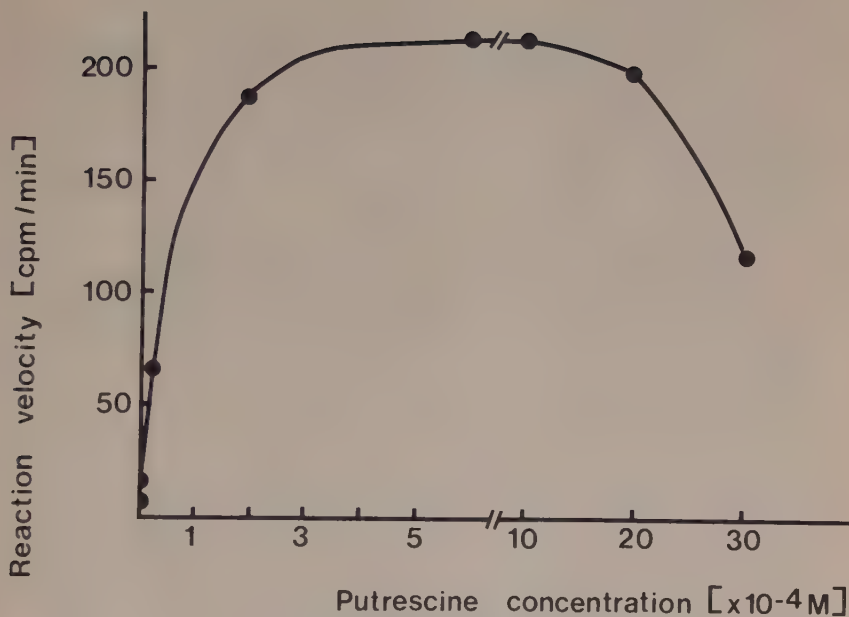


Abb. 12:

Abhängigkeit der Darmdiaminoxydaseaktivität von der Substratkonzentration. Mittelwerte aus zwei Versuchen. pH 7,6. Bestimmung der Diaminoxydaseaktivität im Isotopentest.

Supraoptimale Substratkonzentrationen wirken hemmend auf das Enzym, wie dies auch von Diaminoxydasen anderer Herkunft z. B. von der DAO aus Schweineniere und keimenden Erbsen bekannt ist. Als Michaeliskonstante ergab sich für Putrescin eine Substratkonzentration von $1 \times 10^{-4} \text{ M}$. Da das Substratspektrum eines Enzyms, dem möglicherweise entgiftende Eigenschaften zugeschrieben werden, von besonderem Interesse ist, untersuchten wir die Desaminierungsgeschwindigkeit von 34 verschiedenen Aminen bei jeweils vier verschiedenen Konzentrationen. Es wurden folgende Gruppen von Aminen untersucht:

1. Aliphatische Diamine, 2. aliphatische Monoamine, 3. Amine mit aromatischen Ringverbindungen, wobei besonders Histamin mit seinen Derivaten berücksichtigt wurde und 4. verschiedene Amine, die sich nicht zu einer einheitlichen Gruppe zusammenfassen ließen.

Die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden in Relation zur Desaminierungsrate von Cadaverin bei einer Konzentration von 10^{-3} M gesetzt, die in Tab. 9 den Wert von 100 % bildet. Der Umsatz dieses Amins wurde deshalb als Bezugsgröße verwendet, weil Cadaverin neben Putrescin das bevorzugte Substrat der Diaminoxydase darstellt und in Arbeiten verschiedener Autoren häufig zur Prüfung der Diaminoxydase-Aktivität verwendet wurde.

Die Ergebnisse der Untersuchungsreihen sind in Tab. 9 - 12 dargestellt.

Von den kurzkettigen aliphatischen Diaminen wurden weder Diaminomethan noch Diaminoäthan von der Diaminoxydase angegriffen. Erst beim Diaminopropan setzte in höheren Konzentrationen (10^{-3} M und $5 \times 10^{-3} \text{ M}$) die Desaminierung mit 16 % bzw. 50 % - bezogen auf den Umsatz von Cadaverin - ein. Mit zunehmender Kettenlänge nimmt auch die Reaktionsgeschwindigkeit zu. Bei einer Kettenlänge von 4 - 6 Methylengruppen erreicht sie das Optimum. Hervorzuheben ist,

Determination of Michaelis Constant for Intestinal
DAO with Putrescine as Substrate (Lineweaver-Burk)

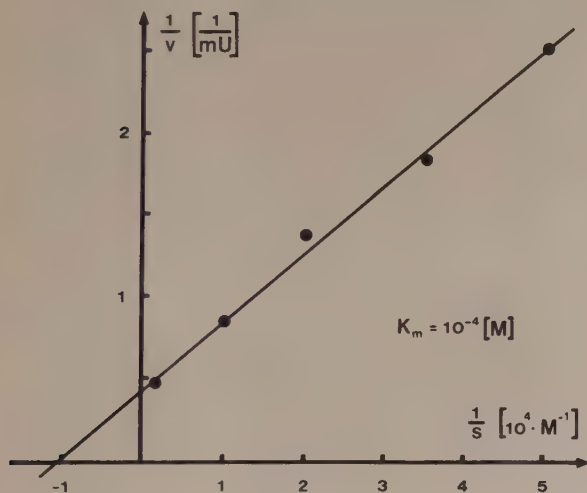


Abb. 13:

Bestimmung der Michaeliskonstante der Diaminoxidase
des Hundedünndarmes nach LINEWEAVER-BURK.

Substrat: Putrescin; pH 7,6; Mittelwerte aus zwei
Versuchen. Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität
im Isotopentest.

daß Diaminobutan in einer Konzentration von $10^{-3}M$ mit 120 % die relative Reaktionsgeschwindigkeit des Cadaverin (Diaminopentan) übertrifft. Bei längeren Ketten nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit wieder ab, bis beim Diaminononan nur noch in höheren Konzentrationen ($10^{-3}M$ und $5 \times 10^{-3}M$) 17 % bzw. 4 % der Vergleichsgeschwindigkeit gemessen werden konnten.

Bei den aliphatischen Monoaminen war bei einzelnen Substanzen eine Reaktion mit der Diaminoxydase nur in höheren Konzentrationen nachzuweisen. Auch hier erwiesen sich die Amine mit einer Kettenlänge von 4 - 6 Methylgruppen als die besten Substrate. Propylamin erreichte mit 40 % bei einer Konzentration von $5 \times 10^{-3}M$ die größte relative Reaktionsgeschwindigkeit. Butylamin erreichte in der Konzentration von $2 \times 10^{-4}M$ noch 7 % und in der Konzentration von $10^{-3}M$ noch 10 % der Vergleichsgeschwindigkeit.

Bei den Untersuchungen mit aromatischen Aminen fanden wir, daß das Histamin 51 % der Reaktionsgeschwindigkeit des Vergleichssubstrates Cadaverin erreichte, wobei allerdings die Substratkonzentration nur 1/10 derjenigen von Cadaverin betrug. Ringmethylierte Histaminderivate waren ebenfalls Substrate der Diaminoxydase, nicht dagegen seitenkettenmethylierte Histamine.

Bei typischen Substraten der Monoaminoxydase, nämlich bei Serotonin und Tyramin, konnten wir in den höheren Konzentrationen von $5 \times 10^{-3}M$ hohe relative Reaktionsgeschwindigkeiten nachweisen. So erreichte Serotonin 90 % der Vergleichsgeschwindigkeit. Benzylamin erwies sich mit einer Desaminierungsrate von 120 % überraschend sogar als besseres Substrat als Cadaverin.

Substanz	relative Reaktionsgeschwindigkeit Cadaverin $[10^{-3}\text{M}] = 100\%$			
	10^{-4}M	$2 \times 10^{-4}\text{M}$	10^{-3}M	$5 \times 10^{-3}\text{M}$
Diamino methan	0	0	0	0
Diamino äthan	<u>3</u>	0	0	0
Diamino propan	0	0	16	<u>50</u>
Diamino butan	18	92	<u>120</u>	100
Diamino pentan	37	80	100	66
Diamino hexan	42	55	<u>75</u>	42
Diamino heptan	26	55	<u>69</u>	10
Diamino octan	0	8	<u>22</u>	20
Diamino nonan	0	0	<u>17</u>	4

Tab. 9:

Desaminierung von aliphatischen Diaminen durch die Diaminoxydase des Hundedünndarmes. Das Substrat Cadaverin in der Konzentration 10^{-3}M als Bezugssubstanz mit 100 % Reaktionsgeschwindigkeit ist durch Umrahmung gekennzeichnet. Die größten relativen Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Substrate sind jeweils unterstrichen.

Substanz	relative Reaktionsgeschwindigkeit Cadaverin $[10^{-3}M] = 100 \%$			
	$10^{-4}M$	$2 \times 10^{-4}M$	$10^{-3}M$	$5 \times 10^{-3}M$
Methylamin	0	0	0	<u>10</u>
Äthylamin	0	0	0	<u>6</u>
Propylamin	0	0	0	<u>40</u>
Butylamin	0	7	10	<u>13</u>
Pentylamin	0	0	0	0
Hexylamin	0	0	0	0
Heptylamin	0	0	12	<u>13</u>
Octylamin	0	0	0	0

Tab. 10:

Desaminierung von aliphatischen Monoaminen durch die Diaminoxidase des Hundedünndarmes. Das Substrat Cadaverin in der Konzentration $10^{-3}M$ wurde als Bezugssubstanz gewählt und entsprach somit 100 % der Reaktionsgeschwindigkeit. Die größten relativen Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Substrate sind jeweils unterstrichen.

Substanz	relative Reaktionsgeschwindigkeit Cadaverin $[10^{-3}M] = 100 \%$			
	$10^{-4}M$	$2 \times 10^{-4}M$	$10^{-3}M$	$5 \times 10^{-3}M$
Histamin	<u>51</u>	50	23	25
1-Methyl- histamin	14	24	28	<u>33</u>
2-Methyl- histamin	19	<u>27</u>	21	9
5-Methyl- histamin	3	7	7	22
N-Methyl- histamin	0	0	0	<u>10</u>
N',N-Dimethyl- histamin	0	0	0	0
Tryptamin	0	0	0	0
Serotonin	0	2	47	<u>90</u>
Tyramin	0	23	27	<u>50</u>
Benzylamin	0	0	23	<u>120</u>

Tab. 11:

Desaminierung von aromatischen Aminen durch die Diamin-
oxydase des Hundedünndarmes. Das Substrat Cadaverin in der
Konzentration $10^{-3}M$ wurde als Bezugssubstanz gewählt und
entsprach somit 100 % der Reaktionsgeschwindigkeit. Die
größten relativen Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen
Substrate sind jeweils unterstrichen.

Substanz	relative Reaktionsgeschwindigkeit Cadaverin $[10^{-3}\text{M}] = 100 \%$			
	10^{-4}M	$2 \times 10^{-4}\text{M}$	10^{-3}M	$5 \times 10^{-3}\text{M}$
(+)-1-Phenyl- äthylamin	0	0	0	0
(-)-1-Phenyl- äthylamin	0	0	0	0
2-Phenyläthyl- amin	0	<u>4</u>	0	0
N-Phenyläthylen- diamin	5	6	12	<u>25</u>
2-Aminothiazol	0	0	0	<u>10</u>
3-Amino-1,2,4- triazol	0	0	0	0
4-Amino-1,2,4- triazol	0	0	0	0
5-Aminotetrazol	0	0	0	0
3-Methylamino- propylamin	0	0	5	<u>21</u>

Tab. 12:

Desaminierung verschiedener Amine durch die Diaminoxydase des Hundedünndarmes. Das Substrat Cadaverin in der Konzentration 10^{-3}M wurde als Bezugssubstanz gewählt und entsprach somit 100 % der Reaktionsgeschwindigkeit. Die größten relativen Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Substrate sind jeweils unterstrichen.

Die in der letzten Tabelle (12) zusammengefaßten verschiedenen Amine erwiesen sich nicht als Substrate der Diaminoxydase des Darmes mit Ausnahme des N-Phenyläthylamin, das in einer Konzentration von $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 25 % der Reaktionsgeschwindigkeit des Cadaverin erreichte.

4.5. Beeinflussung von DAO-Aktivität, Histidin- und Histaminkonzentration und des Proteingehaltes im Dünndarm des Hundes durch intestinale Ischämie:

Das breite Substratspektrum der Diaminoxydase des Darmes ermöglicht es, dem Enzym biogene Amine, wie Serotonin und Histamin, die in Darmwand und Darminhalt vorkommen, anzugreifen und zu inaktivieren. Ob dies jedoch eine Aufgabe des Enzyms ist, die ihm unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen zukommt, ist nicht geklärt. Als ein möglicher Zugang zu diesem Problem wurde die Untersuchung von Veränderungen der Aktivität der DAO angesehen, die durch experimentelle Ischämie ausgelöst wurden. Da die Ischämie einen der schwersten Eingriffe darstellt, waren bei diesem Versuchsmodell Veränderungen am ehesten zu erwarten.

Veränderungen im gesamten Dünndarm:

Die Ergebnisse der Veränderungen von Diaminoxydaseaktivität und der Histaminkonzentration im gesamten Dünndarm des Hundes, die durch eine Ischämie am terminalen Ileum verursacht wurden, sind in Abb. 15 dargestellt.

Nach 10-stündiger Ischämiedauer war die Diaminoxydaseaktivität im gesamten Dünndarm um durchschnittlich 51 % angestiegen, obwohl die Gewebsentnahmen zu Versuchsende im Hinblick auf den oben erwähnten Gradienten in der Verteilung des Enzyms proximal von der Gewebsentnahmestelle

zu Versuchsbeginn ausgeführt worden war. Der Anstieg der DAO-Aktivität erwies sich im T-Test für gepaarte Daten als statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Im Gegensatz zum Anstieg der Aktivität der Diaminoxidase fiel die Histaminkonzentration im Jejunum und Ileum beträchtlich ab. Trotz einer erheblichen Streuung der Werte, die wohl der Verwendung von Bastardhunden zuzuschreiben ist, war dieser Abfall der Histaminkonzentration, der durchschnittlich 77 % betrug, im T-Test für gepaarte Daten statistisch signifikant ($p < 0,05$). Durch den Anstieg der DAO-Aktivität und die Abnahme des Histamingehaltes verstärkte sich die reziproke Korrelation zwischen beiden Parametern von $r = -0,76$ (vor der Ischämie) auf $r = -0,99$ am Ende des Versuches. Besonders deutlich war der Abfall der Histaminkonzentration im proximalen Darmabschnitt, wo der Gehalt von $29,3 \pm 23,2 \mu\text{g/g}$ vor der Ischämie auf $5,2 \pm 8,9 \mu\text{g/g}$ nach der Ischämie abfiel.

Die Untersuchung des Histidin- und Proteingehaltes des Dünndarmes ergab zunächst, daß keiner dieser beiden Parameter eine Verteilung entlang des Darmes zeigte (Abb. 16) wie DAO oder Histamin.

10 Stunden nach Anlegen der Ischämie im terminalen Ileum war die Histidinkonzentration im gesamten nicht-ischämischen Dünndarm um durchschnittlich 33 % angestiegen, wobei der Anstieg im Ileum (Gewebsentnahmestellen I und II) im T-Test für gepaarte Daten signifikant war.

Der Proteingehalt des Dünndarmes wurde durch die Ischämie im terminalen Ileum nicht beeinflusst.

Veränderungen in der ausgeschalteten Schlinge:

Bemerkenswert war, daß die bisher beschriebenen Effekte der intestinalen Ischämie im nicht-ischämischen Anteil des Dünndarmes abliefen, der nicht von der Nahrungspassage ausgeschlossen war. In der ausgeschalteten Schlinge ergaben sich

jedoch wiederum Veränderungen, die ebenfalls alle vier untersuchten Parameter betrafen (Abb. 18 und 20).

DAO-Aktivität und Histaminkonzentration in der ausgeschalteten Schlinge verhielten sich im nicht-ischämischen Teil ähnlich wie die Veränderungen im gesamten übrigen Dünndarm. So stieg im nicht-ischämischen Teil der Schlinge die Diaminoxydase-Aktivität von $19,0 \pm 13,0$ mU/g auf $28,7 \pm 11,0$ mU/g um 51 % an ($p < 0,05$).

Die Histaminkonzentration nahm unter gleichen Bedingungen um 42 % von $7,0 \pm 10,0$ µg/g auf $4,1 \pm 4,0$ µg/g ab ($p < 0,05$). Im ischämischen Teil der ausgeschalteten Schlinge standen die Veränderungen von Diaminoxydase-Aktivität und Histaminkonzentration in scharfem Gegensatz zu den Veränderungen im nicht-ischämischen Teil. Hier nahm die Diaminoxydase-Aktivität um 55 % signifikant ($p < 0,02$) von $19,0 \pm 13,0$ mU/g auf $8,5 \pm 6,7$ mU/g ab, während die Histaminkonzentration um mehr als 100 % von $7,0 \pm 10,0$ µg/g auf $14,2 \pm 9,3$ µg/g statistisch signifikant ($p < 0,05$) anstieg.

Da sowohl der ischämische wie der nicht-ischämische Teil der ausgeschalteten Schlinge abgeschlossene Räume bildeten, war es möglich, den Inhalt, der sich während der 10 Stunden Versuchsdauer angesammelt hatte, zu untersuchen. In den Inhalten der beiden Teile der ausgeschalteten Schlinge veränderten sich die untersuchten Parameter unterschiedlich. Der Darminhalt des nicht-ischämischen Darmteiles enthielt mit $61,3 \pm 34,0$ mU/g ($n = 10$) eine sehr hohe Diaminoxydase-Aktivität, während der Histamingehalt mit $3,3 \pm 5,3$ µg/g ($n = 8$) dagegen relativ niedrig war. Entgegengesetzt waren die Verhältnisse im Inhalt des ischämischen Darmteiles. Dort war die Diaminoxydase-Aktivität mit $21,7 \pm 12,3$ mU/g deutlich geringer als im nicht-ischämischen Teil der Schlinge, die Histaminkonzentration von $12,3 \pm 23$ µg/g dagegen wesentlich höher (Abb. 19).

Der Histidingehalt und die Proteinkonzentration waren im ischämischen Teil der ausgeschalteten Darmschlinge stärkeren Veränderungen unterworfen, als im übrigen Darm. Dies gilt sowohl für die Veränderungen in der Darmwand als auch für diejenigen im Darminhalt (Abb. 20 und 21). Im ischämischen Darmteil stieg der Histidingehalt von $64,8 \pm 37,0 \mu\text{g/g}$ auf $120,0 \pm 78,0 \mu\text{g/g}$. Der Inhalt des ischämischen Darmes enthielt mit $122,0 \pm 87,0 \mu\text{g/g}$ deutlich mehr Histidin als der Darminhalt des nicht-ischämischen Darmes ($58,0 \pm 23,0 \mu\text{g/g}$).

Die Proteinkonzentration im ischämischen Darmteil stieg von $129 \pm 38 \text{ mg/g}$ auf $202 \pm 84 \text{ mg/g}$ an.

Die Untersuchung der genannten vier Parameter bei scheinoperierten Hunden (siehe Methodik) ergaben eine nicht-signifikante Steigerung der Diaminoxidaseaktivität von 12 % ($n = 10$), gemessen mit dem o-Aminobenzaldehydtest und von 15 % ($n = 5$), gemessen im Isotopentest. Histamin- und Histidinkonzentration sowie der Proteingehalt des Gewebes zeigten bei den scheinoperierten Tieren keine Veränderungen.

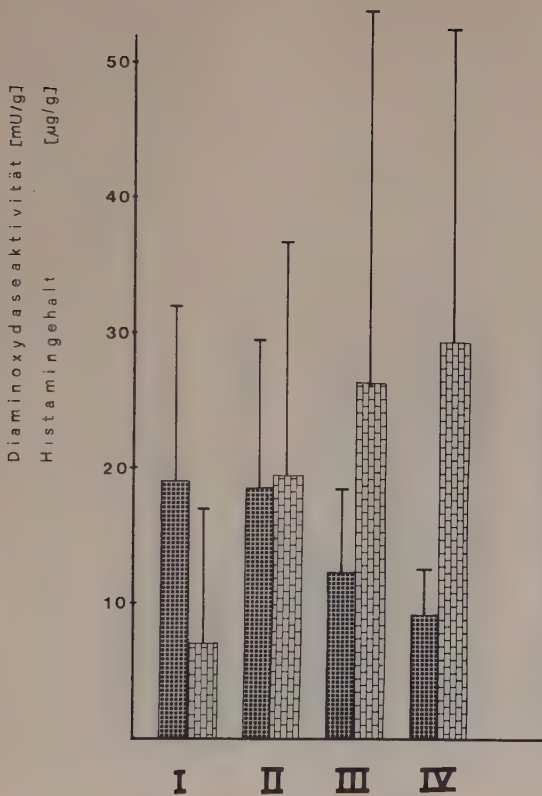


Abb. 14:

Diaminoxidaseaktivität und Histamingehalt des normalen Hundedünndarmes ($n = 10$; $\bar{x} \pm S.D.$). Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität im o-Aminobenzaldehydtest. Bestimmung des Histamingehaltes fluorometrisch nach Ionenaustauscherchromatographie.

■ Diaminoxidaseaktivität

▨ Histamingehalt

Gewebsentnahmestellen I - IV siehe Methodik.

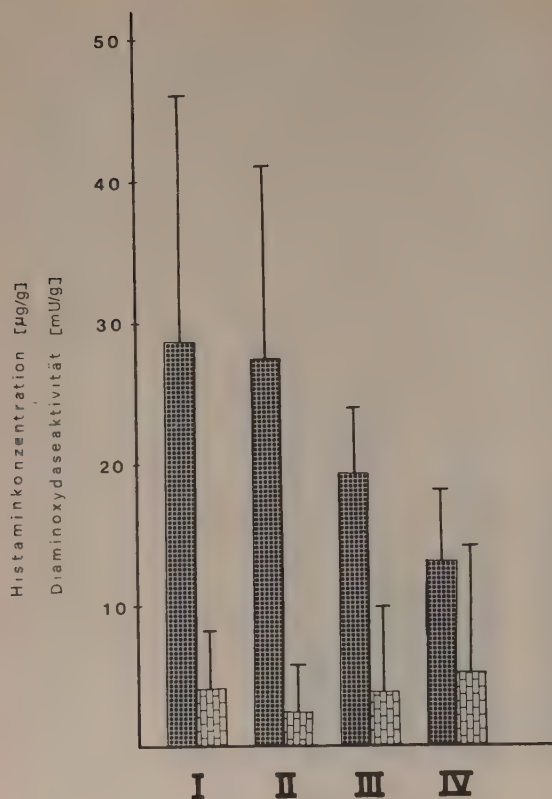


Abb. 15:

Diaminoxidaseaktivität und Histamingehalt des Hundedünndarmes nach 10 Stunden Ischämie ($n = 10$; $\bar{x} \pm S.D.$). Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität im o-Aminobenzaldehydtest. Bestimmung des Histamingehaltes fluorometrisch nach Ionenaustauscherchromatographie.

■ Diaminoxidaseaktivität

▨ Histamingehalt

Gewebsentnahmestellen I - IV siehe Methodik.

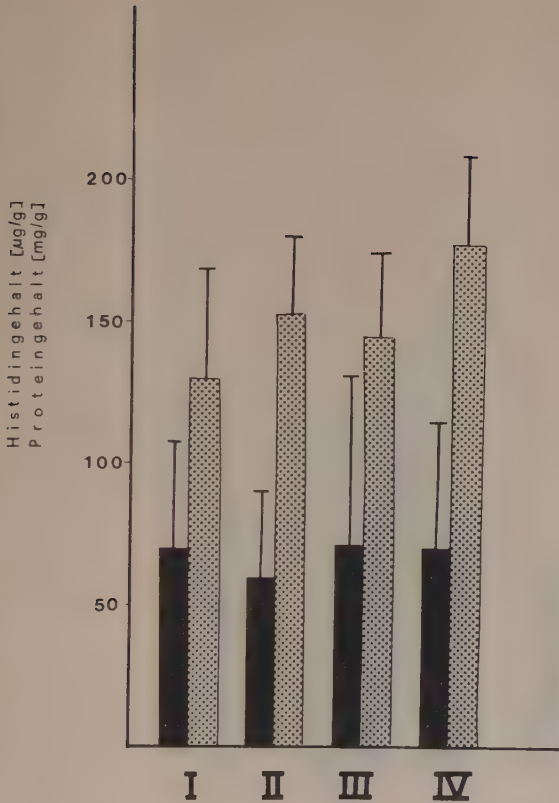


Abb. 16:

Histidin- und Proteingehalt des normalen Hundedünndarmes ($n = 10$; $\bar{x} \pm S.D.$). Bestimmung des Histidingehaltes fluorometrisch nach Ionenaustauscherchromatographie. Bestimmung des Proteingehaltes mit Hilfe der Biuretreaktion nach WEICHELBAUM (1946).

■ Histidingehalt

▨ Proteingehalt

Gewebsentnahmestellen I - IV siehe Methodik.

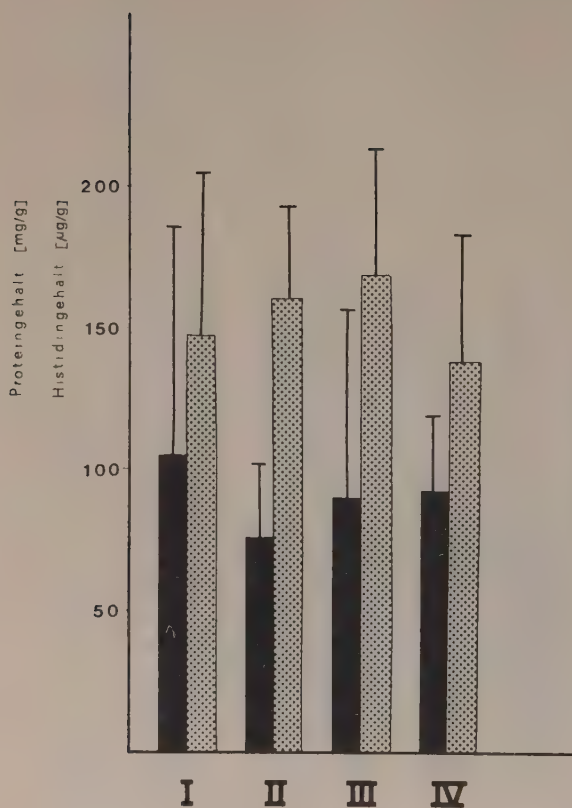


Abb. 17:

Histidin- und Proteingehalt des Hundedünndarmes nach 10 Stunden Ischämie ($n = 10$; $\bar{x} \pm S.D.$). Bestimmung des Histidingehaltes fluorometrisch nach Ionenaustauscherchromatographie. Bestimmung des Proteingehaltes mit Hilfe der Biuretreaktion nach WEICHSELBAUM (1946).



Histidin



Protein

Gewebsentnahmestellen siehe Methodik.

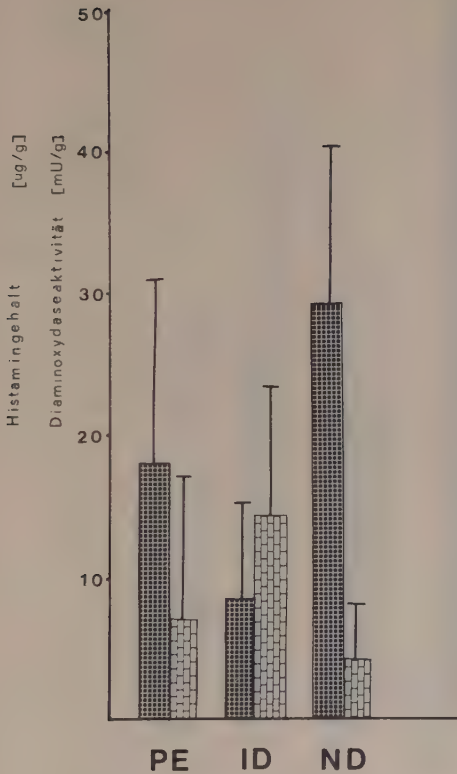


Abb. 18:

Diaminoxydaseaktivität und Histamingehalt in der ausgeschlossenen Darmschlinge des terminalen Ileum vor und nach experimenteller Ischämie ($n = 10$; $\bar{x} \pm S.D.$). Bestimmung der Diaminoxydaseaktivität im o-Aminobenzaldehydtest. Bestimmung des Histamingehaltes fluorometrisch nach Ionenaustauscherchromatographie.

■ Diaminoxydaseaktivität

▨ Histamingehalt

PE: Gewebentnahme aus der ausgeschlossenen Schlinge vor Ischämie.

ID: Gewebentnahme aus dem ischämischen Schlingenteil (10 Std. Ischämiedauer).

ND: Gewebentnahme aus nicht-ischämischem Schlingenteil (10 Std. nach Versuchsbeginn).

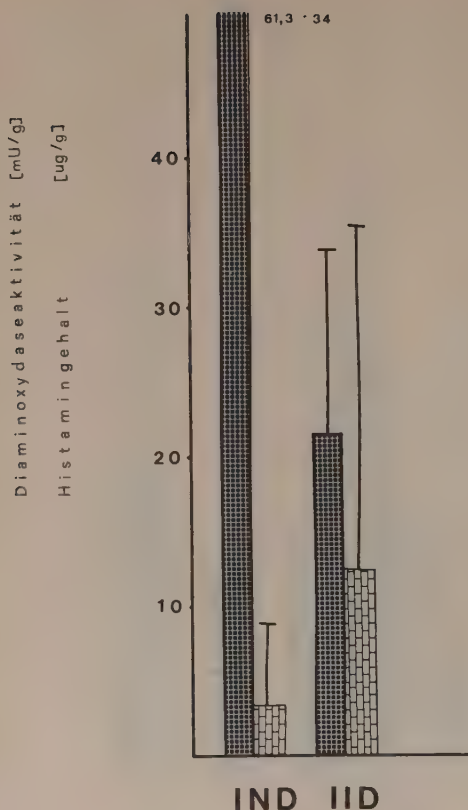


Abb. 19:

Diaminoxidaseaktivität und Histamingehalt im Inhalt der ausgeschlossenen Darmschlinge des terminalen Hundeileum ($n = 10$; $\bar{x} \pm S.D.$). Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität im o-Aminobenzaldehydtest. Bestimmung des Histamingehaltes fluorometrisch nach Ionenaustauscherchromatographie.

▨▨▨▨ Diaminoxidaseaktivität

▨▨▨ Histamingehalt

IND: Inhalt des nicht-ischämischen Schlingenteils (10 Std. nach Versuchsbeginn).

IID: Inhalt des ischämischen Darmes (10 Std. Ischämiedauer).

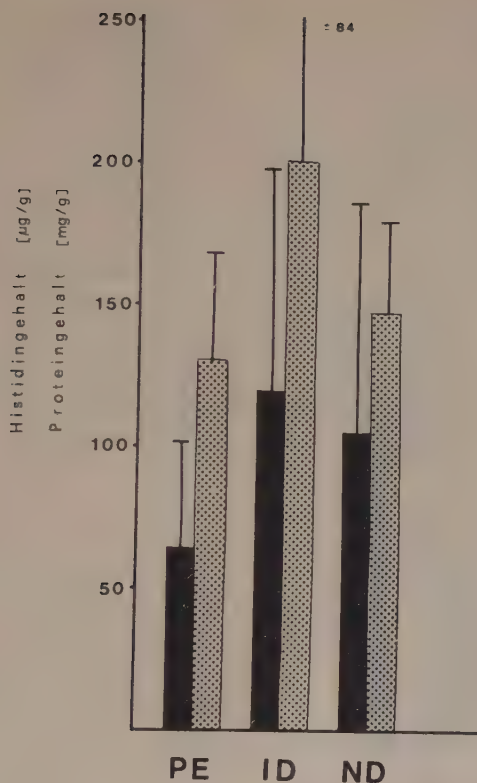


Abb. 20:

Histidin- und Proteingehalt in der ausgeschlossenen Darmschlinge des terminalen Ileum vor und nach experimenteller Ischämie. ($n = 10$; $\bar{x} \pm S.D.$). Bestimmung des Histidingehaltes fluorometrisch nach Ionenaustauscherchromatographie. Bestimmung des Proteingehaltes mit Hilfe der Biuretreaktion nach WEICHSELBAUM (1946).

■ Histidin

▨ Protein

PE: Gewebsentnahme aus der ausgeschlossenen Schlinge vor Ischämie.

ID: Gewebsentnahme aus dem ischämischen Schlingenteil. (10 Std. Ischämiedauer).

ND: Gewebsentnahme aus nicht-ischämischem Schlingenteil. (10 Std. nach Versuchsbeginn).

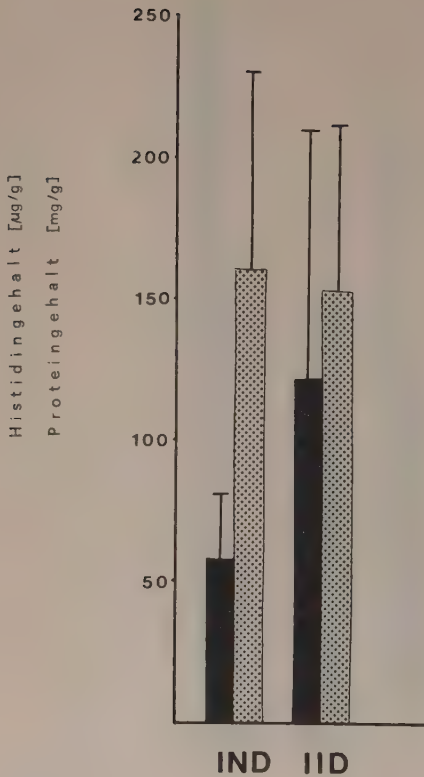


Abb. 21:

Histidin- und Proteingehalt im Inhalt der ausgeschlossenen Darmschlinge des terminalen Hundeileum. ($n = 10$; $\bar{x} \pm \text{S.D.}$). Bestimmung des Histidingehaltes fluorometrisch nach Ionenaustauscherchromatographie. Bestimmung des Proteingehaltes mit Hilfe der Biuretreaktion nach WEICHSELBAUM (1946).

■ Histidingehalt

▨ Proteingehalt

IND: Inhalt des nicht-ischämischen Schlingenteils (10 Std. nach Versuchsbeginn).

IID: Inhalt des ischämischen Darmes (10 Std. Ischämiedauer).

5. Diskussion:

5.1. Eigenschaften und Vorkommen der Diaminoxydase des Hundedünndarmes:

Zur Untersuchung der Eigenschaften der Diaminoxydase des Hundedünndarmes benutzten wir das nach Chromatographie an DEAE-Cellulose 132-fach angereicherte Präparat, da - wie erwähnt - das nach Gelfiltration an Sephadex G 200 734-fach angereicherte Enzym so wenig stabil war, daß sich Testreihen, die sich über einen Arbeitstag hinzogen, nicht durchführen ließen. Neben der Untersuchung von allgemeinen Reaktionsbedingungen, die zur Erstellung eines optimalen Inkubationsansatzes erforderlich waren, war vor allem das Verhalten des Enzyms in Gegenwart von spezifischen Inhibitoren und von verschiedenen Substraten von Interesse.

Der Einfluß der beiden Aminoxydasen-Hemmstoffe Pargylin (spezifisch für die Hemmung der Monaminoxydase) und Aminoguanidin (spezifisch für die Hemmung der Diaminoxydase) wies für das Darmenzym in Gegenwart von Putrescin die typischen Eigenschaften einer klassischen Diaminoxydase nach. Hinsichtlich des Umsatzes einiger Substrate stimmt die Diaminoxydase des Hundedarmes mit den Eigenschaften von Diaminoxidasen anderer Organe oder Spezies gut überein, es gibt jedoch auch deutliche Unterschiede, die vor allem die Breite des Substratspektrums betreffen. So oxidieren, ebenso wie die Darmdiaminoxydase, die Enzyme aus menschlicher Placenta und aus Schweineniere (KAPELLER-ADLER, 1965a; MONDOVI et al., 1964) Cadaverin etwa doppelt so schnell wie Histamin. Bei der Erbsendiaminoxydase beträgt dieses Verhältnis 20 : 1 (LORENZ et al., 1967).

Weitere Übereinstimmungen ergeben sich darin, daß

1. kurzkettige Monoamine wie z. B. Propylamin nicht nur von der Diaminoxydase des Darmes desaminiert werden (FOUTS et al., 1957),
2. ringmethylierte Histaminderivate auch für die Diaminoxydase aus Schweineniere gute Substrate darstellen (KAPELLER-ADLER, R. and IGGO, B., 1957; KAPELLER-ADLER et al., 1963; ZELLER, 1963) und
3. seitenkettenmethylierte Histaminderivate keine Substrate der Diaminoxydase darstellten (KAPELLER-ADLER und IGGO, 1957; AKES et al., 1943).

Der wesentlichste Unterschied zwischen der Diaminoxydase des Hundedünndarmes und anderen Diaminoxydasen z. B. aus Schweineniere besteht vor allem in der Breite des Substratspektrums von ersterem Enzym. Sollte sich aufgrund des noch zu erbringenden Nachweises der Einheitlichkeit des vorliegenden Enzympräparates bestätigen, daß die Diaminoxydase des Darmes in der Lage ist, unter einer Reihe von Monoaminen und Diaminen Histamin und Serotonin zu inaktivieren, so muß diesem Enzym wohl eine Entgiftungs- und Schutzfunktion von großer pathophysiologischer Bedeutung zugeschrieben werden.

Bereits bei der ersten systematischen Zusammenstellung von Ergebnissen über das Vorkommen von Diaminoxydase im Säugerorganismus (ZELLER, 1942) zeigte es sich, daß neben Niere, Leber, Lunge und Placenta der Darm zu den Organen mit der höchsten Aktivität dieses Enzyms gehört. Während aber unter den bisher untersuchten Spezies in dem einen oder anderen der genannten Organe keine Diaminoxydaseaktivität gefunden wurde, z. B. in der Niere von Nagern, ließ sich das Enzym im Darm bei allen Arten messen, und zwar in relativ hoher Aktivität. Diese außerordentliche Regelmäßigkeit des Vorkommens, die bei biogenen Aminen und den an ihrem Stoffwechsel beteiligten Enzymen nicht häufig ist, ließ an eine spezielle Funktion des Darmenzyms bei den Säugern denken.

Da der Darm auch zu den Organen zählt, die den höchsten Gehalt an Histamin im Säugerorganismus aufweisen, lag es nahe, an einen funktionellen Zusammenhang dieser beiden Parameter in der Darmwand zu denken.

Die Hypothese eines Zusammenhangs von DAO-Aktivität und Histaminkonzentration im Dünndarm wird weiterhin dadurch gestützt, daß DAO-Aktivität und Histaminkonzentration miteinander in einer signifikanten Korrelation standen. Eine Steigerung der Enzymaktivität führte in allen Fällen zur Abnahme der Konzentration im Gewebe, die in allen nicht von der Ischämie betroffenen Darmteilen zu beobachten war. Dagegen war eine Verminderung der Enzymaktivität, wie sie im ischämischen Gewebe zu finden war, verbunden mit ansteigenden oder zumindest nicht verminderten Histamingehalten.

5.2. Bedeutung von vasoaktiven Stoffen bei der intestinalen Ischämie:

Die Frage nach der Ursache des schweren Krankheitsbildes, das sich in der Folge von Zuständen von Darmhypoxie entwickelt, stand im Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen. Gekennzeichnet ist der klinische Krankheitsverlauf durch einen nur schwer beeinflussbaren Blutdruckabfall, der häufig, z. B. beim Mesenterialinfarkt oder bei verschiedenen Ileuszuständen, zum Tod des Patienten führt.

In den verschiedenen Experimenten zur Darmischämie wurde eine Vielzahl verschiedenster kreislaufaktiver Substanzen gefunden (GRUBER, 1967; MESSMER, 1967), deren Beteiligung am pathophysiologischen Geschehen bei Darmhypoxie z. T. nur vermutet werden kann. Andere Stoffe, darunter vor allem vasoaktive Polypeptide und biogene Amine, wurden während und nach Darmischämie vermehrt nachgewiesen, so daß sich durch ihr Auftreten möglicherweise das schwere Krankheitsbild erklären läßt.

Im einzelnen sind es die folgenden wirksamen Verbindungen, die insbesondere beim Mesenterialarterienverschluß im Kreislauf nachgewiesen wurden:

Bradykinin, ein Nonapeptid, und Kallidin, ein Dekapeptid, deren Aminosäuresequenz 1961 von WERLE et al. aufgeklärt wurde.

Bradykinin vermindert den Tonus der glatten Muskulatur der Gefäße und setzt so den Gefäßwiderstand herab. Diese Wirkung führt zu einem erhöhten Blutdurchfluß im Bereich des Splanchnikusgebietes, der auch einen Abfall des Blutdruckes im Gesamtkreislauf nach sich ziehen kann. Neben dieser vasodilatatorischen Wirkung verursacht Bradykinin noch eine Erhöhung der Darmmotilität.

Das von MUTT (1971) gefundene vasoaktive intestinale Peptid besteht aus einer Kette von 28 Aminosäuren. Es wurde aus dem oberen Hundedünndarm isoliert. Seine Wirkung sind ein Anstieg des Blutflusses in der Arteria mesenterica superior und verbunden damit, trotz Steigerung des cardiac output, eine Senkung des Blutdruckes im allgemeinen Kreislauf. Die Wirkungsweise des vasoaktiven intestinalen Peptids ist hauptsächlich auf die Gefäße des Splanchnikusgebietes beschränkt, da es in der Leber inaktiviert wird.

Mit einem Molekulargewicht von 500 - 1000 stellt der als Peptid charakterisierte myocardial depressant factor (LEFER et al., 1967/1970) eine Substanz dar, die im Gastrointestinaltrakt vorkommt und sich schädigend auf den Organismus auswirkt. Bedingt durch eine Minderdurchblutung im Splanchnikusgebiet, in deren Folge eine Hypoxie auftritt, kommt es zur Zerreißung von Lysosomen und Freiwerden von Proteasen. Diese lysosomalen Enzyme sind für Entstehung und Bildung des myocardial depressant factor von ausschlaggebender Bedeutung. Der myocardial depressant factor setzt die Herzkontraktilität herab und führt zu einer Verengung der Gefäße im Splanchnikusgebiet, wodurch die Hypoxie und damit

auch seine Bildung verstärkt wird. Weiterhin trägt dieses toxische Peptid zu einer Verminderung der reticuloendothelialen Phagocytose bei und vermindert dadurch seine Entfernung aus dem Kreislauf.

Neben den Polypeptiden spielen biogene Amine, wie Catecholamin, Serotonin und Histamin, bei Durchblutungsstörungen des Darmes eine große Rolle.

Entsprechend der gezeigten starken sympathischen Innervation des Darmes greifen Catecholamine, wie Adrenalin und vor allen Dingen Noradrenalin, in Darmmotorik und Durchblutung ein. Im Vordergrund steht dabei die Wirkung von Noradrenalin auf α -Rezeptoren. Dies führt schon bei sehr geringen Noradrenalin Dosen zu einer Kontraktion der Gefäße im Splanchnikusgebiet und damit zur Minderdurchblutung. Auf die Darmmuskulatur wirkt Noradrenalin erschlaffend bei gleichzeitig kontrahierender Wirkung auf die Sphinkteren.

Serotonin und Histamin erreichen bei den meisten Spezies unter allen Organen ihre höchste Konzentration im Gastrointestinaltrakt. Der Darm reagiert auf Alteration höchst empfindlich mit einer Freisetzung dieser Amine, was für Serotonin nach geringer Druckbelastung der Mukosa von BÜLBRING und CREMA (1959) und für Histamin nach operativen Eingriffen in der Bauchhöhle von LORENZ u. Mitarb. (1974) nachgewiesen wurde. Bei einem so schweren Eingriff in das Stoffwechselgeschehen des Darmes, wie ihn die Ischämie darstellt, kommt es deshalb zu erheblichen Veränderungen der Serotonin- und Histaminkonzentration.

Die pharmakologische Wirkung von Serotonin am Darm besteht in einer Beeinflussung der glatten Muskulatur. Es kommt zu einer Steigerung der Darmmotilität, zur Kontraktion von großen Gefäßen im Splanchnikusgebiet und zu einer Dilatation von Arteriolen und Venolen.

Histamin, das andere biogene Amin, das bei pathologischen Prozessen im Darm eine Rolle spielen könnte, ist im Darm vor allem in der Mukosa lokalisiert. Von den pharmakologischen Wirkungen des Histamins bei Hypoxie des Darmes ist die Stimulierung der Darmmotilität, die Auslösung einer Hypotension und Permeabilitätsstörung, die auch im Bereich der Mesenterialgefäße nachgewiesen wurde, von Bedeutung.

Daß nicht nur chemisch definierte Substanzen bei einer Hypoxie der Darmwand eine Rolle spielen, zeigt die umfangreiche Literatur, die das Endotoxin für die entstehende Hypotension verantwortlich macht. Zumal der Darmtrakt außerordentlich dicht mit Bakterien besiedelt ist, lag es nahe, für das schwere Krankheitsbild nach Darmischämie eine Bakteriämie oder bakteriell bedingte Endotoxinämie verantwortlich zu machen. Da Endotoxin jedoch nicht direkt an der glatten Gefäßmuskulatur angreift, kann es an der hypotensiven Kreislaufreaktion nur über Mediatorsubstanzen beteiligt sein. Tatsächlich besteht ein enger Zusammenhang zwischen Verabreichung von Endotoxin, Histaminanstieg im Plasma und Blutdruckabfall. Neben einer Freisetzung von Histamin spielt dabei möglicherweise eine vermehrte Neubildung des Amins eine Rolle, nachdem SCHAYER (1966) eine Zunahme der Histidindecarboxylase nach Endotoxin-Injektion beobachtete.

Das Darmtoxin jedoch schlechthin wurde trotz intensiver Suche bis heute nicht gefunden. Es ist daher anzunehmen, daß bei pathologischen Prozessen während der Darmhypoxie verschiedene Substanzen zusammenwirken.

Ein Anstieg der Konzentration von Bradykinin im Pfortaderblut nach Verschuß der Arteria mesenterica superior wurde von KOBOLD und THAL (1963) nachgewiesen. Die Autoren glaubten, daß lysosomale Proteasen, die durch den ischämiebedingten Zelluntergang frei werden, vermehrt aktives Brady-

kinin entstehen lassen, das durch seine vasodilatatorische Wirkung mit zur Auslösung des Schocks nach Arteria mesenterica superior-Verschluß beiträgt. Ähnliche Vorgänge werden für das Auftreten und die Wirkung des vasoaktiven intestinalen Peptids bei hypoxischen Zuständen in der Darmwand angenommen.

Der von LEFER et al. (1967/1970) gefundene myocardial depressant factor entsteht während der Ischämie durch proteolytischen Abbau von intrazellulären Proteinen, wahrscheinlich ebenfalls unter dem Einfluß lysosomaler Proteasen. Überdies sind lysosomale Hydrolasen, die im Schock in den Kreislauf gelangen, verhängnisvoll, da sie den Organismus für die Wirkung des myocardial depressant factor sensibilisieren. Dieser Faktor entsteht zwar während der Darmischämie, entfaltet seine Wirkung jedoch erst nach Lösen der Okklusion, wenn er in den Kreislauf hineingeschwemmt wird. Er trägt dann durch eine Beeinträchtigung der Abwehrmechanismen zur Schockletalität bei.

Bei allen Zuständen der Darmhypoxie löst reflektorische Freisetzung von Adrenalin und vor allen Dingen Noradrenalin in der Initialphase eine starke Kontraktion der Darmgefäße aus, die dem Organ ein zunächst blasses Aussehen geben. Sowohl beim Ileus als auch in der Revaskularisationsphase wirkten α -Rezeptorenblocker günstig auf die Mesenterialdurchblutung und damit auf die Überlebenszeit von Versuchstieren ein.

Beim Arteria mesenterica superior-Verschluß wurde ein Anstieg der Serotoninkonzentration im Pfortaderblut bei verschiedenen Spezies nachgewiesen. Verantwortlich für den Anstieg der Serotoninkonzentration im Pfortaderblut können verschiedene Stimuli sein, wie die Zunahme des Serotoningehaltes in dem von der Ischämie nicht betroffenen Duodenum oder die vermehrte Bildung des Amins durch Darmbakterien. Nach den Befunden von STRAUSS (1973) erfolgte keine

Zunahme der Serotoninkonzentration im Pfortaderblut bei Verschuß der Arteria mesenterica superior, wenn die Nervi Vagi durchtrennt waren, so daß auch an eine reflektorische Serotoninfreisetzung gedacht werden muß.

Eine Freisetzung von Histamin nach Mesenterialarterienverschuß wurde ebenfalls durch die Feststellung des Anstiegs des Amins im Pfortaderblut wahrscheinlich gemacht. RICHTER (1974) wies in der Perfusionsflüssigkeit aus dem Gefäßbett des ischämischen Kaninchendarmes Histaminmengen nach, die, falls sie in das allgemeine Gefäßsystem gelangten, eine beträchtliche Kreislaufwirkung erzeugen könnten.

5.3. Die Diaminoxidase als entgiftendes Enzym:

Histamin stellt - soweit bisher bekannt - das einzige vasoaktive Substrat der DAO im Säugerorganismus dar. Andererseits steht die DAO am Beginn des Stoffwechselweges, der neben der Methylierung des Amins der biologisch bedeutendste ist. Es erscheint daher berechtigt, die Frage zu stellen, ob die Wirksamkeit von Histamin mit der jeweiligen Aktivität der DAO im Zusammenhang steht, d. h., ob sich die Histaminwirkung durch eine Hemmung des Enzyms steigern läßt oder durch einen Anstieg der Enzymaktivität vermindert. Auf eine mögliche Schutzfunktion der freigesetzten Diaminoxidase gegenüber im Kreislauf zirkulierendem Histamin wiesen SCHMUTZLER et al. (1965) hin. Mit Heparin vorbehandelte Meerschweinchen überlebten den Histaminschock häufiger als nicht vorbehandelte Kontrolltiere, da Heparin zu einem Anstieg des Enzyms im Plasma führt und damit zur rascheren Abnahme der Histaminkonzentration. In die gleiche Richtung weisen Versuche von WERLE und SCHIRREN (1965), die durch exogene Zufuhr von gereinigter Erbsen-Diaminoxidase die Überlebensrate von Meerschweinchen im anaphylaktischen Schock signifikant steigern konnten.

Heparin setzt bei zahlreichen Säugerspezies bedeutende Diaminoxidasemengen in den Kreislauf frei. Diese Histaminaseliberierung konnte auch durch andere saure Polysaccharide ausgelöst werden (GLANZMANN et al., 1971; SCHMUTZLER et al., 1969; SCHMUTZLER et al., 1966a/1966b). Die Herkunft des Enzyms ist bei den untersuchten Spezies (HANSSON und THYSELL, 1968) unterschiedlich. Die Injektion von Heparin verursacht beim Meerschweinchen die Freisetzung von Diaminoxydase aus der Leber (BERNAUER et al., 1964; BUFFONI, 1966; GIERTZ et al., 1964; HAHN et al., 1969; SCHMUTZLER, 1966a). Dieser Effekt wurde auch beim Menschen (SCHMUTZLER, 1968; HANSSON et al., 1966; HANSSON et al., 1970) und Hund (SCHMUTZLER, 1966a) nachgewiesen. Bei Ratte und Kaninchen erfolgte die heparininduzierte Freisetzung ausschließlich aus dem Darm (HANSSON und THYSELL, 1968; KOBAYASHI et al., 1969; GLANZMANN und GLANZMANN, 1971).

Ein weiterer Hinweis auf den Zusammenhang von Diaminoxydase-Aktivität und Histaminkonzentration im Organismus ist der Anstieg beider Größen im Blut des Meerschweinchens nach Auslösung eines anaphylaktischen Schocks (HAHN et al., 1970). Die Freisetzung des Enzyms führt auch hier zu einer raschen Eliminierung von Histamin aus dem Kreislauf (ROSE und LEGER, 1952).

Die Potenzierung toxischer Wirkungen von Histamin durch die Verabreichung von Aminoguanidin ist von ebenso großer Bedeutung, um Hinweise auf eine mögliche Entgiftungsfunktion der Diaminoxydase im Organismus zu erhalten. Die hypotensive Wirkung von Histamin wurde bei der Katze wesentlich gesteigert, wenn Aminoguanidin in die Nierenarterie injiziert wurde. Die Injektion des Hemmstoffes in die Arteria femoralis blieb dagegen wirkungslos (LINDELL und WESTLING, 1956). Ein ähnlicher Effekt wurde auch

am Hund nachgewiesen (LINDELL, 1957). Diese Befunde zeigen, daß eine Potenzierung der Histaminwirkung nur dort auftrat, wo Aminoguanidin an einem Organ mit hoher Diaminoxydase-Aktivität wirksam wurde.

Im Gastrointestinaltrakt ließ sich die Potenzierung der Histaminwirkung durch Aminoguanidin am Magen und am Darm zeigen. Die Verabreichung von 100 mg/kg des Diaminoxydase-hemmstoffes steigerte bei der Ratte beim hypothermen Streß mit wahrscheinlich erhöhtem Plasmahistaminspiegel signifikant die Zahl der Magenulcera (FEIFEL und LORENZ, 1972). Die physiologische Bedeutung der Diaminoxydase bei der Inaktivierung von oral zugeführtem Histamin wies SJAASTED 1967 beim Schaf nach. Die Behandlung der Tiere mit Aminoguanidin führte bei Histaminverfütterung zu einer Steigerung der Ausscheidung von freiem Histamin im Urin bis um das 22-fache. Gleichzeitig traten schwere toxische Erscheinungen, wie Anorexie, Distension des Abdomens, Steigerung von Körpertemperatur sowie Zunahme von Puls- und Atemfrequenz auf. Die vorliegenden Ergebnisse weisen somit an zahlreichen Beispielen eine Wirksamkeit von Aminoguanidin in vitro und in vivo als spezifischen Hemmstoff der Diaminoxydase nach. Es kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß der Diaminoxydasehemmstoff bei der intestinalen Ischämie in pathophysiologische Prozesse eingreift, die mit dem Histamin- bzw. Aminstoffwechsel in Zusammenhang stehen.

5.4. Die Bedeutung der Veränderung von DAO-Aktivität und Histaminkonzentration bei intestinaler Ischämie:

Die Veränderungen der DAO-Aktivität und der Histaminkonzentration im Dünndarm des Hundes, die bei der Durchführung des experimentellen Modells der Ischämie am terminalen Ileum beobachtet werden, fügen sich gut in das vorher gezeichnete Bild der Veränderungen von Histamin und Histaminstoffwechsel ein.

Die Bestimmung eines so allgemeinen Parameters wie der Proteingehalt und besonders die Tatsache, daß dieser Parameter während der Versuchsdauer unverändert bleibt, zeigt, daß die Veränderung der anderen Parameter, wie Histamingehalt und DAO-Aktivität, mit großer Wahrscheinlichkeit spezifisch ist. Die einzige Ausnahme bildet möglicherweise der ischämische Teil des Dünndarmes, der einen Anstieg der Proteinkonzentration um 56 % zeigt. Vorausgesetzt dieser Effekt wird durch einen Flüssigkeitsverlust aus dem Gewebe und somit durch eine Konzentration des Proteins bewirkt, so könnte auch die Zunahme des Histamingehaltes in diesem Gewebe z. T. auf einer Konzentrierung beruhen. Mit einiger Sicherheit ist jedoch die Verminderung der DAO-Aktivität im ischämischen Gewebe spezifisch, ein Ergebnis, das auch durch Untersuchungen am ischämischen Kaninchendarm (RICHTER, 1974) unterstützt wird.

Außer nach der Spezifität der Veränderungen von DAO-Aktivität und Histamingehalt stellt sich die Frage, in welchem Zusammenhang die Befunde, insbesondere im nicht-ischämischen Teil des Dünndarmes, mit der Ischämie am terminalen Ileum stehen.

So könnte die Abnahme der Histaminkonzentration in der nicht-ischämischen Darmwand bedingt sein durch eine Freisetzung von Histamin aus atypischen Mastzellen, und zwar aufgrund von reflektorischen oder humeralen Regulationsvorgängen im Splanchnikusgebiet. Ein Modell für diese Vorgänge beschreibt möglicherweise RÄSÄNEN (1960), der eine Histaminliberierung aus Mastzellen des Rattenmagens durch Glukokortikoide nachwies. REIFFERSCHIED (1965) faßte die angesprochenen Mechanismen im Ablauf einer Darmhypoxie unter dem Begriff des "primären Streß beim Ileus" zusammen und unterschied drei Phasen: 1. eine sympathikotone, 2. eine parasympathikotone, 3. eine zentrale Phase, die mit einer Ausschüttung von ACTH verbunden ist.

Die Frage nach den Ursachen des Anstiegs der DAO-Aktivität in der Darmwand könnte durch Ergebnisse von SOUTHREN et al. (1966 a + b/1970) beantwortet werden, die feststellten, daß die DAO der Placenta ein induzierbares Enzym ist und, daß Histamin möglicherweise der Induktor ist. Dem Enzym käme somit die Aufgabe zu, das freigesetzte und somit wirksame Histamin am Ort der Freisetzung rasch zu inaktivieren.

Andererseits kann man jedoch auch sicher sein, daß die 10-stündige Darmischämie in der gesamten Bauchhöhle entzündliche Prozesse dort hervorruft, so daß die vorgelegten Ergebnisse auch im Zusammenhang mit Befunden von LAHIRI und BASU (1970) gesehen werden müssen, der einen Anstieg der DAO-Aktivität der Darmwand auf Hypothermiereiz hin feststellte. Die Hypothermie soll dabei als eine Art Entzündungsmodell gelten.

Ähnliches fanden BIEGANSKI und MASLINSKI (1974), die nach experimentell induzierten subcutanen Entzündungsherden eine ansteigende DAO-Aktivität im Plasma vom Meerschweinchen registrierten.

Da jedoch auch Entzündungsvorgänge in engem Zusammenhang mit Veränderungen des Aminstoffwechsels, insbesondere des Histaminstoffwechsels, stehen, wird auch von dieser Seite her die Vermutung unterstützt, daß im Dünndarm die physiologische Bedeutung der DAO darin besteht, den Organismus sowohl vor exogenem wie auch vor endogenem Histamin zu schützen, soweit letzteres unter pathologischen Bedingungen frei wird. Es erscheint daher berechtigt, der DAO eine Rolle als entgiftendes Enzym zuzuschreiben.

6. Zusammenfassung:

- 1.) Die Diaminoxydase, ein Enzym, das Histamin oxydativ desaminiert, kommt bei allen bisher untersuchten Säugerspezies im Dünndarm vor. Beim Hund wurden in diesem Organ 5,7 - 32,6 mU/g Gewebe gemessen. Unter den Bedingungen einer experimentellen Darmischämie wurden Diaminoxydaseaktivität, Histamingehalt sowie Histidin- und Proteinkonzentration im Intestinaltrakt untersucht, um aus Veränderungen von Diaminoxydaseaktivität und Histaminkonzentration Hinweise auf eine pathophysiologische Bedeutung des Aminstoffwechsels in der Darmwand zu gewinnen.
- 2.) Die Diaminoxydase aus dem Hundedünndarm wurde 734-fach angereichert und die Eigenschaften des Enzyms untersucht (optimale Substratkonzentration für Putrescin 1×10^{-3} M, $K_m = 1 \times 10^{-4}$ M; pH-Optimum 7,2 - 7,8). Untersuchungen mit den spezifischen Hemmstoffen Pargylin und Aminoguanidin zeigten, daß die Aminoxydase des Darmes eindeutig den Diaminoxydasen zuzuordnen war. Das Verhalten der Diaminoxydase gegenüber 34 verschiedenen Aminen wies auf ein außerordentlich breites Substratspektrum des Enzyms hin. Die besten Substrate waren Cadaverin, Putrescin, Benzylamin, Serotonin und Histamin.
- 3.) Nach einer 10-stündigen Ischämie am terminalen Ileum des Hundes fanden wir im gesamten Dünndarm eine signifikante Zunahme der Diaminoxydaseaktivität um 51 %, wogegen die Histaminkonzentration um 77 % ebenfalls signifikant abnahm. Ähnliche Veränderungen ergaben sich im nicht-ischämischen Teil der ausgeschalteten Schlinge des terminalen Ileum. Im ischämischen Teil dagegen nahm die Diaminoxydaseaktivität signifikant um 55 % ab, während die Histaminkonzentration um mehr als 100 % anstieg.

- 4.) Die vorgelegten Befunde unterstützen die Hypothese einer entgiftenden und schützenden Funktion der Diaminoxidase durch die Inaktivierung des vasoaktiven biogenen Amins Histamin.

7. Literaturverzeichnis:

- AMBROSE, J.A., GRIMM, A., BURTON, J., PAULLIN, K.,
ROSS, C.:
Fluorometric determination of histidine.
Clin. Chem. 15: 361-365 (1969).
- AKES, A.G., WISEGRAVER, B.B. and SHULL, M.A.:
Comparative physiological actions of some
-(imidazolyl-4-) alkylamines.
J. Pharm. 77: 54-62 (1943).
- ARUNSLAKSHANA, O., MORGAN, J.L., SCHILD, H.O.:
Potentiation of pharmacological effects of histamine by histaminaseinhibitors.
J. Physiol. 123: 32-54 (1954).
- BARDSLEY, W.G. and HILL, C.M.:
A study of the substrate-binding site in dog
kidney diamine oxidase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 41: 1068-1070 (1970).
- BERGERET, B., BLASCHKO, H. and HAWES, R.:
Occurance of an amine oxidase in horse serum.
Nature (London) 180: 1127-1128 (1957).
- BERGMEIER, H.U.:
Methoden der enzymatischen Analyse.
Bd. 1, 2. Aufl., Verlag Chemie: 149 (1970).
- BERNAUER, W., GIERTZ, H., HAHN, F., SCHMUTZLER, W.,
SESEKE, G. und SIEVERS, B.U.:
Zum Mechanismus der Histaminaseaktivierung im
anaphylaktischen Schock.
Naturwissenschaften 51: 412-413 (1964).
- BEST, C.H.:
The disappearance of histamine from autolysing
lung tissue.
J. Physiol. 67: 256-263 (1929).
- BEST, C.H. and Mc HENRY, E.:
The inactivation of histamine.
J. Physiol. 70: 349-372 (1930).
- BIEGANSKI, T. and MASLINSKI, Cz.:
Histamine, Putrescine and Benzylamine oxidation
during subcutaneous tissue inflammation in Guinea-Pig.
Agents and Actions vol. 4/3: 190-191 (1974).

- BLASCHKO, H.:
Enzymatic oxidation of diamines.
1. Int. Congress Biochem., Cambridge: 565 (1949).
- BLASCHKO, H., FRIEDMANN, P.J., HAWES, R. and NIELSSON, N.:
The amine oxidases of mammalian plasma.
J. Physiol. 145: 384-404 (1959).
- BOVET, D. und BOVET-NITTI, F.:
Médicaments du système nerveux végétatif.
S. Karger Basel (1948).
- BROWN, D.D., TOMCHICK, R. and AXELROD, J.:
The distribution and properties of a histamine-methylating enzyme.
J. Biol. Chem. 234: 2948-2950 (1959).
- BUFFONI, F.:
Histaminase and related amine oxidase.
Pharmacol. Rev. 18: 1163-1199 (1966).
- BÜLBRING, E. and CREMA, A.:
The action of 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxytryptophan and reserpine on intestinal peristalsis in anaesthetized guinea-pigs.
J. Physiol. 146: 29-53 (1959).
- BURKARD, W.:
Contribution à l'étude de l'histaminase.
Foulon R., Paris (1954).
- BURKARD, W., GEY, K.F. und PLETSCHER, A.:
Inhibition of diamine in vivo by hydrazinederivates.
Biochem. Pharmacol. 3: 249-255 (1960).
- CARLSTEN, A.:
On the sources of the histaminase. Present in Thoracic Duct Lymph.
Acta Physiol. Scand. 20 (Suppl. 69): 5-26 (1950).
- COTZIAS, G.C. und DOLE, V.P.:
The activity of histaminase in tissues.
J. Biol. Chem. 196: 235-242 (1952).
- DANFORTH, D.N. and GORHAM, F.:
Placental histaminase.
Am. J. Physiol. 119: 294-295 (1937).
- DAVISON, A.N.:
Pyridoxalphosphate as coenzyme of diamine oxidase.
Biochem. J. 64: 546-548 (1956).

- EDLBACHER, S. und ZELLER, A.:
Über den enzymatischen Abbau des Histamins.
Helv. Chir. Acta 20: 717-726 (1937).
- FEIFFEL, G., LORENZ, W., HUHND, A., ZBORALSKI, B.:
Die Bedeutung von Histamin bei der Pathogenese
akuter Erosion im Rattenmagen.
Res. exp. Med. 157: 206-207 (1972).
- FOUTS, J.R., BLANKSMA, L.A., CARBON, J.A. und ZELLER, E.A.:
Amine oxidases XIII. monoamines as substrat of
diamine oxidase.
J. Biol. Chem. 225: 1025-1031 (1957).
- GERBER, D.A.:
Determination of histidine in serum with o-phthaldialdehyde.
Anal. Biochem. 34: 500-504 (1970).
- GESSLER, R.M., MATSUBA, M. and DRAGSTEDT, C.A.:
Observations on the histaminolytic activity of dog
thoracic duct lymph.
J. Pharmacol. exp. Therap. 116: 356-365 (1956).
- GIERTZ, H., HAHN, F., SCHMUTZLER, W. und SESEKE, G.:
Histaminaseaktivierung durch Heparin und Protaminsulfat bei Meerschweinchen.
Klin. Wschr. 42: 1034-1035 (1964).
- GLANZMANN, Ch. und GLANZMANN-ZAPEL, J.:
Histaminasefreisetzung beim Kaninchen durch Heparin,
andere Polyanionen und Protamin.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 268: 434-445 (1971).
- GORYACHENKOVA, E.V.:
On the nature of the active centers of diamine oxidase
(histaminase).
Biochemia 21: 247-251 (1956 a).
- GORYACHENKOVA, E.V.:
On the mode of action of diamine oxidase (histaminase).
Biochemia 21: 322-328 (1956 b).
- GORYACHENKOVA, E.V. und USPENSKAIA, V.D.:
(Engl. Übersetzung).
Biochemia 23: 199 (1958).
- GREEN, A.L.:
The inhibition of monoamine oxidase by arylalkylhydrazines.
Biochem. J. 84: 217-223 (1962).

GREEN, A.L.:

Studies on the mechanism of inhibition of monoamine oxidase by hydrazine derivatives.
Biochem. Pharmacol. 13: 249-261 (1964).

GRUBER, U.F.:

Intestinale Faktoren im Schock: Darmtoxine.
Langenb. Arch. klin. Chir. 319: 909-925 (1967).

HAHN, F. and MÉSZÁROS, E.:

Effect of heparine, protamine sulfat and antigen on histaminase (diamine oxidase) activity of the guinea-pig liver.
Arch. int. Pharmacondyn. 180: 195-205 (1969).

HAHN, F., KRETZSCHMAR, R., TESCHENDORF, H.J. and MITZE, R.:
Role of histaminase (diamine oxidase) in disappearance of plasma histamine in anaphylaxis and after histamine injektion.
Int. Arch. Allergy 39: 449-458 (1970).

HANSSON, R., HOLMBERG, C.G., TIBBLING, G., TRYDING, N., WESTLING, H. and WETTERQUIST, H.:
Heparin-induced diamine oxidase increase in human blood plasma.
Acta med. Scand. 180: 533-536 (1966).

HANSSON, R. and THYSELL, H.:

Diamine oxidase in blood plasma in some vertebrates and anondonta cygnea before and after injektion of heparin.
Acta Physiol. Scand. 74: 533-542 (1968).

HANSSON, R. and SUNDSTRÖM, G.:

Diamine oxidase (histaminase) and heparin inhibition of gastric secretion in man.
Scand. J. clin. Invest. 26: 263-269 (1970).

HOLMSTEDT, B. and THAM, R.:

A septrophotometric method for determination of diamine oxidase (DAO) activity.
Acta Physiol. Scand. 45: 152-163 (1959).

HOLMSTEDT, B., LARSSON, L. and THAM, R.:

Further studies of a spectrophotometric method for the determination of diamine oxidase activity.
Biochem. Biophys. Acta 48: 182-186 (1961).

KAPELLER-ADLER, R.:

The effect of sex hormones on histaminase in:
"Histaminase".

Ciba Found. Symp. Churchill, London: 272-277 (1956).

KAPELLER-ADLER and IGGO, B.:

Histamine and its derivatives in human urine.

Biochem. Biophys. Acta 25: 395-402 (1957).

KAPELLER-ADLER, R.:

The isolation of imidazole acetaldehyde as the only
metabolite of the action in vitro of placental histaminase on histamine.

Biochem. Biophys. Acta 37: 527-530 (1960).

KAPELLER-ADLER, R. and Mac FARLANE, H.:

Purification and identification of dog kidney histaminase.

Biochem. Biophys. Acta 67: 542-565 (1963).

KAPELLER-ADLER, R.:

Recent attempts at the purification and identification
of human placental "histaminase".

Clin. Chim. Acta 11: 191-193 (1965 a).

KAPELLER-ADLER, R.:

Histamine catabolism in vitro and in vivo.

Fed. Proc. 24: 757-765 (1965 b).

KAPELLER-ADLER, R.:

Amine oxidase and methods for their study.

Wiley-Interscience.

A Division of John Wiley & Son, New York, London,
Sidney, Toronto (1970).

KIRSTEN, E., GEREZ, C., KIRSTEN, R.:

Eine enzymatische Mikrobestimmung des Ammoniaks,
geeignet für Extrakte tierischer Gewebe und Flüssigkeiten.

Biochem. Z. 337: 312-319 (1963).

KOBAYASHI, Y. and IVY, A.C.:

Histamine metabolizing activity of dog stomach and
intestine.

Amer. J. Physiol. 195: 525-527 (1958).

KOBAYASHI, Y. and IVY, A.C.:

Histamine metabolizing activity of the stomach and
intestine of the rat.

Amer. J. Physiol. 196: 835-836 (1959).

- KOBAYASHI, Y., KUPELIAN, J. and MANDSLEY, D.V.:
Release of diamine oxidase by heparine in the rat.
Biochem. Pharmacol. 18: 1585-1591 (1969).
- KOBOLD, E.E. and THAL, A.P.:
Quantitation and identification of vasoactive substances liberated during various types of experimental and clinical intestinal ischemia.
Surg. Gyn. & Obstetr. 117: 315-322 (1963).
- KUSCHE, J. and LORENZ, W.:
A new method for concomitant determination of l-histidine and histamine in tissues and body fluids.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. Suppl. to Vol. 270, R 81 (1971).
- KUSCHE, J., RICHTER, H., HESTERBERG, R., SCHMIDT, J., LORENZ, W.:
Comparison of the ¹⁴C-putrescine assay with the NADH-test for the determination of diamine oxidase. Description of a standard procedure with high precision and improved accuracy.
Agents and Actions 3: 148-156 (1973 a).
- KUSCHE, J., RICHTER, H., SCHMIDT, J., HESTERBERG, R., SPECHT, Ch., LORENZ, W.:
Intestinal diamine oxidase (DAO): Isolation, substrate-specificity and pathophysiological significance.
Agents and Actions 3: 182-183 (1973 b).
- KUSCHE, J.:
Persönliche Mitteilung (1974).
- LAHIRI, S.C. and BASU, A.:
Experimental model for the study of tissue histaminase activity after in vitro injury.
Bull. Calcutta School Trop. Med. 18: 72-73 (1970).
- LEFER, A.M., COWGILL, R., MARSHALL, F.E., HALL, L.M., BRAND, E.D.:
Characterization of a myocardial depressant factor present in hemorrhagic shock.
Amer. J. Physiol. 213: 492-498 (1967).
- LEFER, A.M. and MARTIN, J.:
Origin of myocardial depressant factor in shock.
Amer. J. Physiol. 218: 1423-1427 (1970).
- LINDAHL, K.M., LINDELL, S.E., WESTLING, H. and WHITE, T.:
Histamine degradation in tissue extracts from the cat.
Acta Physiol. Scand. 38: 280-287 (1957).

LINDBERG, S.:

^{14}C -histamine elimination from the blood of pregnant and non-pregnant women with special reference to the uterus.

Acta Obstetr. & Gynec. Scand. 62 (Suppl. 1): 1-25 (1963a).

LINDBERG, S., LINDELL, S.E. and WESTLING, H.:

The metabolism of ^{14}C -labelled histamine injected into the umbilical artery.

Acta Obstetr. & Gynec. Scand. 62 (Suppl. 1): 35-48 (1963 b).

LINDBERG, S., LINDELL, S.E. and WESTLING, H.:

Formation and inactivation of histamine by human fetal tissues in vitro.

Acta Obstetr. & Gynec. Scand. 62 (Suppl. 1): 49-58 (1963 c).

LINDELL, S.E. and WESTLING, H.:

Potentialiation by histamine inhibitors of the blood pressure responses to histamine in cats.

Acta Physiol. Scand. 37: 307-323 (1956).

LINDELL, S.E.:

Effects of histaminase inhibitors on the blood pressure responses in dogs to histamine injected into the renal artery.

Acta Physiol. Scand. 41: 168-186 (1957).

LINDELL, S.E., NIELSON, K., SCHEYER, R.W. and WESTLING, H.:

Metabolism of injected ^{14}C -histamine in pregnant women.

J. Physiol. 143: 62 (1958).

LORENZ, W., KUSCHE, J. und WERLE, E.:

Über eine neue Methode zur Bestimmung der Diaminoxidase-aktivität.

Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 348: 561-567 (1967).

LORENZ, W., KUSCHE, J. and WERLE, E.:

Determination of diamine oxidase, urease and histidin ammonialyase by enzymatic assay of ammonia.

Z. Anal. Chemie 243: 259-263 (1968).

LORENZ, W., SCHAUER, A., HALBACH, St., MATEKJA, E. and WERLE, E.:

Biochemical and histochemical studies on histamine in the digestive tract, distribution in different chordates and cellular stores in the dog.

Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharm. exp. Path. 264: 274-275 (1969 a).

- LORENZ, W., SCHAUER, A., HALBACH, St., CALVOER, R.
and WERLE, E.:
Biochemical and histochemical studies on the distribution of histamine in the digestive tract of man, dog and other mammals.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharm. exp. Path. 265:
81-100 (1969 b).
- LORENZ, W., BENESCH, L., BARTH, H., MATEKJA, E., KUSCHE, J.,
HUTZEL, M. and WERLE, E.:
Fluorometric assay of histamine in tissue and body fluids: Choice of purification procedure and identification in the nanogram range.
Z. Anal. Chem. 352: 94-98 (1970 a).
- LORENZ, W., KUSCHE, J. und WERLE, E.:
Diaminoxidase
in: Methoden der enzymatischen Analyse
Herausgeber: H.H. Bergmeyer 2. ed. Verlag Chemie:
630-635 (1970 b).
- LORENZ, W., BARTH, H., KUSCHE, J., REIMANN, H.J., SCHMAL, A.,
MATEKJA, E., MATHIAS, Ch., HUTZEL, M., WERLE, E.:
Histaminase in the pig: Determination, distribution, release and pharmacological actions.
Europ. J. Pharmacol. 14: 155-175 (1971).
- LORENZ, W., REIMANN, H.J., BARTH, H., KUSCHE, J., MEYER, R.,
DOENICKE, A., HUTZEL, M.:
A sensitive and specific method for the determination of histaminase in human whole blood and plasma.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie 353: 911-920 (1972).
- LORENZ, W., SEIDEL, W., DOENICKE, A., TAUBER, R., REIMANN, H.J., UHLIG, R., MANN, G., DORMANN, P., SCHMAL, A.,
HÄFNER, G., HAMELMANN, H.:
Elevated plasma histamine concentrations in surgery: Causes and clinical significance.
Klin. Wschr. 52: 419-425 (1974).
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FUR, A.L. and RANDALL, R.J.:
Protein measurement with the folin reagent.
J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951).
- Mac INTOSH, F.C. and PATON, W.D.M.:
The liberation of histamine by certain organic bases.
J. Physiol. 109: 190-219 (1949).
- MAVOR, G.E.:
Superior mesenteric artery occlusion.
Proc. Royal Soc. Med. 54: 356-359 (1961).

MESSMER, K.:

Intestinale Faktoren im Schock: Intestinaler Kreislauf.
Langenb. Arch. klin. Chir. 319: 890-909 (1967).

MONDOVI, B., ROTILIO, G., FINAZZI, A. and SCIOSCIA-SANTORO, A.:

Purification of pig-kidney diamine oxidase and its
identity with histaminase.

Biochem. J. 91: 408-415 (1964).

MONDOVI, B., ROTILIO, G., COSTA, M.F., FINAZZI-AGRO, A.,
CHIANCOME, L., HANSEN, R.E. and BEINERT, H.:

Diamine oxidase from pig kidney.

J. Biol. Chem. 242: 1160-1167 (1967).

MUTT, V. and JORPES, E.:

Hormonal polypeptides of the upper intestine.

Biochem. J. 125: 57-58 (1971).

OKUYAMA, T. and KOBAYASHI, Y.:

Determination of diamine oxidase by liquid scintilla-
tion counting.

Arch. Biochem. Biophys. 95: 242-250 (1961).

PISANO, J.J., WILSON, J.B., COREN, L., ABRAHAM, D. and
UDENFRIED, S.:

Isolation of γ -aminobutyryl histidine (homocarnosine)
from brain.

J. Biol. Chem. 236: 499-502 (1961).

RÄSÄNEN, T.:

Mucosal mast cells of rat stomach: influence of ACTH,
cortisone and growth hormone.

Gastroenterologie 38: 70-75 (1960).

REIFFERSCHIEDT, M.:

Die Pathophysiologie des Darmverschlusses.

Zbl. Chir. (Kongreßband) Vol. 90: 1539-1542 (1965).

Report of the Commission on Enzymes of the International
Union of Biochemistry (I.U.B.) Symposium Series:

Pergamon Press Oxford, London, Paris, New York Vol. 20:
(1961).

RICHTER, H., KUSCHE, J., SCHUMANN, K.Th., SCHMIDT, J.,
LORENZ, W.:

Diamine oxidase and histamine in the small intestine
after experimental ischemia.

Brit. J. Surg. 59: 912 (1972).

RICHTER, H.:

Diaminoxidase im Dünndarm von Mensch, Hund und Kaninchen:
Frage einer protektiven Rolle bei akuter intestinaler
Ischämie.

Habilitationsschrift (1974).

RICHTERICH, R.:

Klinische Chemie.

IIInd. Edition Akad. Verl. Gesellschaft Frankfurt (1968).

ROSE, B. and LEGER, J.:

Serum histaminase during rabbit anaphylaxis.

Proc. Soc. exp. Biol. 79: 379-381 (1952).

ROULET, F. und ZELLER, E.A.:

Über die Diaminoxydase der Smegmabazillen.

Helv. Chim. Acta 28: 1326-1342 (1945).

RUSH, B.F., HOST, W.R., FEWEL, J. and HSIEH, J.:

Intestinal ischemia and some organic substance in serum and abdominal fluid.

Arch. Surg. 105: 151-157 (1972).

SARKAR, S., BANERJEE, R., ISE, M.S. and ZELLER, A.E.:

Über die Wirkung von 2-Phenylcyclopropylamin auf die Monoaminoxydase und andere Enzymsysteme.

Helv. Chim. Acta 43: 439-447 (1960).

SCHAYER, R.W.:

Catabolism of physiological quantities of histamine in vivo.

Physiol. Rev. 39: 116-126 (1959).

SCHAYER, R.W.:

Enzymatic formation of histamine from histidine, in histamine and antihistamines.

In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. 18/1 Berlin-Heidelberg-New York, Springer: 688 (1966).

SCHÖPF, C. and OESCHLER, F.:

Ann. Chem. 523: 1 (1936).

SCHMUTZLER, W., GIERTZ, H., HAHN, F., SESEKE, G., BERNAUER, W.

The influence of aminoguanidine and heparine on shock in guinea pigs.

Int. Arch. Allerg. 28: 48-49 (1965).

SCHMUTZLER, W.:

Studien über die Histaminasefreisetzung beim Meer-schweinchen im anaphylaktischen Schock und durch Histaminaseliberatoren.

Habilitationsschrift (1966 a).

SCHMUTZLER, W., HAHN, F., SESEKE, G., BERNAUER, W.:

Über die Herkunft der Plasmahistaminase im anaphylaktischen Schock des Meerschweinchen.

Arch. Pharmak. exp. Path. 252: 332-338 (1966 b).

SCHMUTZLER, W.:

Das Verhalten der Histaminase, Diaminoxidase und Benzylaminooxidase im Blutplasma von Meerschweinchen und Mensch nach intravenöser Injektion von Heparin. Klin. Wschr. 46: 953-956 (1968).

SCHMUTZLER, W., GOLDSCHMIDT, O., BETHGE, K.P. und KNOOP, J.:

The release of guinea pig liver histaminase and some of its properties.

Int. Arch. Allergy 36: 45-55 (1969).

SCHULER, W.:

Zur Hemmung der Diaminoxidase (Histaminase).

Experimenta 8: 230-232 (1952).

SHORE, P.A., BURHALTER, A. and COHN, V.H.:

A method for the fluorometric assay of histamine in tissues.

J. Pharmacol. exp. Therap. 127: 182-186 (1959).

SHORE, P.A. and COHN, V.H.:

Comparative effects of monoamine oxidase inhibitors on monoamine oxidase and diamine oxidase.

Biochem. Pharmacol. 5: 91-95 (1960).

SINCLAIR, H.M.:

Pyridoxalphosphate as coenzyme of histaminase.

Biochem. J. 51: 10-11 (1952).

SJAASTAD, O.V. and STORMORKEN, H.:

Diet and histamine in the ruminant.

Nature (London) 197: 907-908 (1963).

SJAASTAD, O.V.:

Potentiation by aminoguanidine of the sensitivity of sheep to histamine given by mouth. Effect of aminoguanidine on the urinary excretion of endogenous histamine.

J. exp. Physiol. 52: 319-330 (1967).

SNEDECOR, G.W. and COCHREM, W.G.:

Statistical methods.

6. ed., The Iowa State University Press (1967).

SOUTHREN, A.L., KOBAYASHI, Y., CARMOD, N.C., WEINGOLD, A.E.:

Serial measurements of plasma diamine oxidase during normal human pregnancy by an improved method.

Am. J. Obstetr. & Gynec. 95: 615-620 (1966 a).

SOUTHREN, A.L., KOBAYASHI, Y., JUNG, W., WEINGOLD, A.B., CARMODY, N.:

J. Clin. Endocrin. Metab. 26: 1005-1009 (1966 b).

- SOUTHREN, A.L., CALANOG, A.M., MISHNER, S., WEINGOLD, A.B.:
J. Appl. Physiol. 29: 684-686 (1970).
- STRAUSS, R.J., RUBIN, K.A., NEWMANN, F.A., STRAUSS, R.D.,
STUCKEY, J.H.:
Serotonin levels in portal vein plasma after occlusion
of the superior mesenteric artery in dogs with intact
and divided vagus nerves.
Surgery 74: 333-337 (1973).
- STRECKER, H.J.:
In: Methods in Enzymology II.
S.P.O. Colowick and N.O. Kaplan (eds.)
Academic Press New York: 220-225 (1955).
- SZEGO, C.M.:
Role of histamine in mediation of hormone action.
Fed. Proc. 24: 1343-1352 (1964).
- TABOR, H.:
Diamine oxidase.
J. Biol. Chem. 188: 125-136 (1951).
- TRIER, J.S. and PUPIN, C.E.:
Electron microscopy of the small intestine: A review.
Gastroenterology 49: 574-603 (1965).
- UDENFRIEND, S.:
In: Molecular Biology.
Academic Press: 177-187 (1962).
- VALETTE, G., COHEN, Y. und BURKARD, W.:
Répartition de l'histaminase dans différents organes de
certains animaux.
Pharm. Acta Helv. 31: 382-390 (1956).
- WARBURG, O. und CHRISTIAN, W.:
Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von
Gärungsfermenten.
Biochem. Z. 287: 291-328 (1936).
- WATON, N.G.:
Studies on mammalian histidindecaboxylase.
Brit. J. Pharmacol. 11: 119-127 (1956).
- WEICHSELBAUM, T.E.:
Protein determination by the biuret method.
Amer. J. Clin. Path. 10: 40-46 (1946).
- WERLE, E.:
Über das Vorkommen von Diaminoxidase und Histidin-
decarboxylase in Mikroorganismen.
Biochem. Z. 309: 61-76 (1941).

- WERLE, E. und PECHMANN, E.:
Über die Diaminoxydase von Pflanzen und ihre
adaptive Bildung durch Bakterien.
Justus Liebigs Ann. Chem. 562: 44-60 (1949).
- WERLE, E., TRAUTSCHOLD, I. und AURES, D.:
Reinigung und Charakterisierung der Diaminoxydase
aus Erbsen.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie 326: 200-211 (1961).
- WERLE, E. und SCHIRREN, V.:
Einfluß von Diaminoxydasegaben auf den anaphylakti-
schen Schock des Meerschweinchens.
Z. ges. exp. Med. 138: 522-530 (1965).
- ZELLER, A.E.:
Zur Kenntnis der Diaminoxydase. 3. Mitteilung über den
enzymatischen Abbau von Polyaminen.
Helv. Chim. Acta 21: 1645-1665 (1938 a).
- ZELLER, E.A.:
Über den enzymatischen Abbau von Histamin und Diaminen.
Helv. Chim. Acta 21: 880-890 (1938 b).
- ZELLER, E.A., SCHÄR, B. und STAFFLIN, S.:
Weitere Beiträge zur Kenntnis der Diaminoxydase
(Histaminase).
Helv. Chim. Acta 22: 837-850 (1939).
- ZELLER, E.A.:
Über die Beeinflussung der Diaminoxydase durch
Kaliumcyanid.
Helv. Chim. Acta 23: 1418-1441 (1940).
- ZELLER, E.A.:
Diaminoxydase.
Advances in Enzymologie 2: 93-112 (1942).
- ZELLER, E.A.:
Oxidation of amines.
In: The Enzymes Chemistry and Mechanism ad action.
Edited by J.B. Summer and K. Myrbäck, Vol. II/I
Academic Press Inc. New York: 536-558 (1951).
- ZELLER, E.A., FOUTS, J.R., CARBON, J.A., LAZONAS, J.C.,
VOEGTLI, W.:
Über die Substratspezifität der Diaminoxydase.
12. Mitteilung über Aminoxydasen.
Helv. Chim. Acta 39: 1632-1645 (1956).

ZELLER, E.A., BARSKY, J., BERNAU, E.R., CHERKAS, M.S.,
FOOTS, J.R.:
Degredation of mescaline by amine oxidases.
J. Pharmacol. 124: 282-289 (1958).

ZELLER, E.A.:
Diamine oxidases.
The Enzymes
2 nd ed., by J.G. Sumner und K. Myrbäck,
Academic Press Inc. New York Vol. 8: 313-335 (1963).

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren
die Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Aurich, Aust, Berendes, Bommer, Braasch, Brück,
Buchholz, Dimroth, Dittrich, Dölle, Eissner, Engelhardt,
Exner, Friederich, Ganz, Golenhofen, Graul, Hamelmann,
Hamm, Hardewig, Havemann, Heinecker, Hensel, Hess, Heuser,
Hildebrand, Hohorst, Hort, Jacob, Jancke, Kaffarnik, Karl-
son, Klaus, Koch, Koecke, Koransky, Kühnel, Linneweh, Lorenz,
Mahr, Mann, Martini, Nöth, Nultsch, Oehmig, Petry, Pots, Ro-
deck, Rohen, Schiff, Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Sei-
del, Siegert, Spiegelberg, Straub, Strohmeyer, Stuke, Thoe-
nes, Uhlarik, Vakilzadeh, Vogell, Walcher, Wehrmeyer, Wendt,
Wepler.

Herrn Prof. Dr. W. Lorenz danke ich für die Stellung des Themas, für die zahlreichen Anregungen und für die freundliche Durchsicht des Textes.

Herrn Dr. J. Kusche danke ich ganz besonders für die Anleitung und für die vielen Verbesserungsvorschläge während der Versuche, sowie für seine Unterstützung bei der Zusammenstellung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Richter danke ich für die Hilfe bei der Durchführung des tierexperimentellen Teiles der Arbeit.

Bei allen Mitarbeitern des Institutes bedanke ich mich für die freundliche Hilfsbereitschaft während meiner Tätigkeit.

L e b e n s l a u f

Am 19.9.1948 wurde ich als 2. Sohn des Arztes Dr. med. Karl Schumann und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Steinmeister, in Wulferdingsen (Kreis Minden) geboren.

Die Grundschule besuchte ich in Petershagen, Kreis Minden, von Ostern 1956 bis Ostern 1963. Anschließend wechselte ich zum Staatlichen Aufbaugymnasium über, an dem ich 1967 die Reifeprüfung bestand.

Ab Wintersemester 1967 studierte ich an der Philipps-Universität in Marburg zunächst Naturwissenschaften (Biologie), und ab Sommersemester 1968 begann ich mit dem Medizinstudium. Mein Vorphysikum bestand ich 1969 und das Physikum legte ich 1970 ab. Ich famulierte in Kassel, Interlaken/Schweiz und Minden. 1973 bestand ich das Staatsexamen.

Zur Zeit befinde ich mich in der Ausbildung als Medizinalassistent.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel "Die Diaminoxydase des Hundedünndarmes: Reinigung, enzymatische Eigenschaften und patho-physiologische Bedeutung bei intestinaler Ischämie" im Institut für experimentelle Chirurgie und pathologische Biochemie Marburg/Lahn unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Lorenz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 21. 10. 75

Karl-Theodor Schumann

